

(19) 日本国特許庁 ( J P )

(12) 公 開 特 許 公 報 ( A )

(11) 特許出願公開番号

特開平10-101699

(43) 公開日 平成10年(1998) 4月21日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	F I	
C 0 7 K 14/78		C 0 7 K 14/78	
A 6 1 K 35/28		A 6 1 K 35/28	
38/00	A B E	C 0 7 K 16/44	
	A D U	G 0 1 N 33/53	D
C 0 7 K 16/44		33/577	B
審査請求 有 請求項の数 4 F D (全 50 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号	特願平9-240418	(71) 出願人	592090692
(62) 分割の表示	特願昭63-109818の分割		ダナ ファーバー キャンサー インステ イテュート
(22) 出願日	昭和63年(1988) 5月2日		アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 02115 ボストン ビニー ストリート 44
(31) 優先権主張番号	0 4 5 9 6 3	(72) 発明者	ティモシー アレン スプリングー
(32) 優先日	1987年5月4日		アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 02167 チェスナット ヒル モナードノ ック ロード 28
(33) 優先権主張国	米国 ( U S )	(74) 代理人	弁理士 中村 稔 (外4名)
(31) 優先権主張番号	1 1 5 7 9 8		
(32) 優先日	1987年11月2日		
(33) 優先権主張国	米国 ( U S )		
(31) 優先権主張番号	1 5 5 9 4 3		
(32) 優先日	1988年2月16日		
(33) 優先権主張国	米国 ( U S )		
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 I C A M - 1 又はその機能性フラグメントに結合し得る抗体を産生するハイブリドーマ細胞の調製方法

(57) 【要約】

【課題】 I C A M - 1 又はその機能性フラグメントに結合し得る抗体を産生する所望のハイブリドーマ細胞の調製方法の提供。

【解決手段】 (A) ヒト I C A M - 1 の機能性フラグメントを発現する細胞で動物を免疫し、(B) 上記動物のひ臓細胞をミエローマ細胞系と融合させ、(C) 融合させたひ臓細胞とミエローマ細胞に抗体産生性ハイブリドーマ細胞を生成させ、及び(D) 上記ハイブリドーマ細胞を I C A M - 1 に結合し得る抗体を産生し得る所望のハイブリドーマ細胞にスクリーニングする工程を含むことを含む I C A M - 1 又はその機能性フラグメントに結合し得る抗体を産生する所望のハイブリドーマ細胞の調製方法。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 (A) 生理条件下で可溶であり、トランスメンブランドメインが欠落しており、ICAM-1細胞外ドメイン1～5 (図8の残基1～453) のアミノ酸配列を含有し、免疫学的反応性及び天然ICAM-1のICAM-1依存性粘着特性の仲介能力を保持しているヒトICAM-1の機能性フラグメントを発現する細胞で動物を免疫する工程、(B) 上記動物のひ臓細胞をミエローマ細胞系と融合させる工程、(C) 融合させたひ臓細胞及びミエローマ細胞により抗体分泌性ハイブリドーマ細胞を生成させる工程、及び(D) ハイブリドーマ細胞をICAM-1に結合し得る抗体を産生し得る所望のハイブリドーマ細胞にスクリーニングする工程を含むことを特徴とするICAM-1又はその機能性フラグメントに結合し得る抗体を産生する所望のハイブリドーマ細胞の調製方法。

【請求項2】 ヒトICAM-1の機能性フラグメントが、ICAM-1のドメイン1、2及び3を含むか、ICAM-1のドメイン1及び2を含むか又はICAM-1のドメイン1を含むものである請求項1記載の調製方法。

【請求項3】 ヒトICAM-1の機能性フラグメントが、以下の(a)～(q) からなる群から選ばれる少なくとも1種のポリペプチドを含む請求項1又は請求項2記載の調製方法。

- (a) -V-T-C-S-T-S-C-D-Q-P-K;
- (b) -X-G-S-V-L-V-T-C-S-T-S-C-D-Q-P-K;
- (c) -L-L-G-I-E-T-P-L;
- (d) -F-L-T-V-Y-X-T;
- (e) -V-E-L-A-P-L-P;
- (f) -E-L-D-L-R-P-Q-G-L-E-L-F-E;
- (g) -L-N-P-T-V-T-Y-G-X-D-S-F-S-A-K;
- (h) -S-F-P-A-P-N-V;
- (i) -L-R-G-E-K-E-L;
- (j) -R-G-E-K-E-L-K-R-E-P;
- (k) -L-R-G-E-K-E-L-K-R-E-P-A-V-G-E-P-A-E;
- (l) -P-R-G-G-S;
- (m) -P-G-N-N-R-K;
- (n) -Q-E-D-S-Q-P-H;
- (o) -T-P-E-R-V-E-L-A-P-L-P-S;
- (p) -R-R-D-H-H-G-A-N-F-S; 及び
- (q) -D-L-R-P-Q-G-L-E

【請求項4】 (A) 細胞間粘着のアンタゴニストであり得る非免疫グロブリン試剤と、凝集し得る複数の細胞を含有するリンパ球調製物とをインキュベーションすること、(B) 上記リンパ球調製物を検査して上記試剤の存在が上記リンパ球調製物の上記細胞の凝集を抑制するかどうかを測定し、この凝集の抑制により上記試剤を細胞間粘着のアンタゴニストとして同定すること、を含む細胞間粘着の非免疫グロブリンアンタゴニストの同定方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明はリンパ球の群が細胞基質を認識しそれに付着して炎症部位に浸透し炎症反応中細胞と反応する過程に含まれるICAM-1のような細胞間粘着分子又はその機能性フラグメントに結合し得る抗体を産生するハイブリドーマ細胞の調製方法に関する。本発明はさらにそのような細胞間粘着分子に結合し得るリガンド分子、これらリガンドのスクリーニングアッセイ、および該細胞間粘着分子、該リガンド分子および該スクリーニングアッセイの使用に関する。

## 【0002】

【従来の技術】白血球はホストをバクテリアまたはウィルスのような外敵に対して適切に防御するために細胞基質に付着し得なければならない。防御システムの優れた見解はEisen, H. W.により“Micro-biology, 第3版、ペンシルバニア州フィラデルフィア、Harpe 8; Row 社刊、(1980)、290-295および381-418”において提示されている。白血球は内皮細胞に結合できて循環系から進行中の炎症部位に浸透できなければならない。さらに、白血球は抗原提供細胞に付着して正常な特異的免疫応答が起り得ねばならず、さらに、リンパ球は、適当なターゲット細胞に付着してウィルス感染または腫瘍細胞の分解が起り得ねばならない。最近、そのような付着の仲介において含まれる白血球表面分子がハイブリドーマ技術を用いて同定された。要するに、ヒトT-細胞〔Davignon, D.等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 4535-4539 (1981)〕とマウスひ臓細胞〔Springer, T.等、Eur. J. Immunol. 9: 301-306 (1979)〕に対して向けられた各モノクローナル抗体は白血球表面に結合し、上述の付着関連機能を抑制しているものと同定された〔Springer, T.等、Fed. Proc. 44: 2660-2663 (1985)〕。これらの抗体により同定された分子はMac-1およびリンパ球機能会合抗原1 (LFA-1) と称される。Mac-1はマクロファージ、顆粒球および顆粒状リンパ球に見い出されたヘテロダイマーである。LFA-1は大部分のリンパ球に見い出されるヘテロダイマーである〔Springer, T. A. 等、Immunol. Rev. 68: 111-135 (1982)〕。これらの2つの分子、および第3分子p150、95 (これはMac-1と同様な組織分布を有する) は細胞粘着においてある役割を発揮する〔Keizer, G.等、Eur. J. Immunol. 15: 1142-1147 (1985)〕。

【0003】上記の白血球分子は糖たん白質の関連群の1員であることが見い出された〔Sanchez-Madrid, F. 等、J. Exper. Med. 158: 1785-1803 (1983); Keizer, G. D. 等、Eur. J. Immunol. 15: 1142-1147 (1985)〕。この糖たん白質群は1つのアルファ鎖と1つのベータ鎖を有するヘテロダイマ

一からなっている。抗原の各々のアルファ鎖は互いに異なるけれども、ベータ鎖は高度に保護されていることが判明している〔Sanchez-Madrid, F. 等, *J. Exper. Med.* 158: 1785-1803 (1983)〕。糖たん白質群のベータ鎖（ある場合には“CD18”と称す）は95KDの分子量を有することが見い出され、一方アルファ鎖は150KD-180KDで変化することが見い出された〔Springer, T. 等, *Fed. Proc.* 44: 2660-2663 (1985)〕。膜たん白質のアルファサブユニットはベータサブユニットの有する広い相同性を共有していないけれども、糖たん白質のアルファサブユニットの近似分析は両者の間に実質的な類似性があることを示している。LFA-1関連糖たん白質のアルファおよびベータサブユニット間の類似性の検討はSanchez-Madrid, F.等によりなされている〔*J. Exper. Med.* 158: 586-602 (1983)〕; *J. Exper. Med.* 185: 1785-1803 (1983)〕。

【0004】白血球表面上の上記粘着たん白質群のいずれの1員の正常量も明らかにすることができない1群の人々が同定されている〔Anderson, D. C. 等, *Fed. Proc.*, 44: 2671-2677 (1985); Anderson, D. C. 等, *J. Infect. Dis.*, 152: 668-689 (1985)〕。これらの患者からのリンパ球は分子のLFA-1群が抗体により中和されている健常者に類似するインビボ欠陥を示していた。さらにまた、上記の患者は、その細胞の細胞基質への粘着能力なしにより、正常な免疫応答を測定することができない〔Anderson, D. C. 等, *Fed. Proc.* 44: 2671-2677 (1985); Anderson, D. C. 等, *J. Infect. Dis.*, 152: 668-689 (1985)〕。これらのデータは免疫反応がリンパ球がLFA-1群の機能的粘着分子の欠如により正常な形で粘着できない場合には緩和されることを示している。

【0005】即ち、要約すれば、動物の健康および生命力を維持するリンパ球の能力はリンパ球が他の細胞（内皮細胞のような）に粘着できることを必要とする。この粘着はリンパ球の細胞表面上に存在する特異的レセプター分子を含む細胞-細胞接触を必要とすることが判明している。これらのレセプターはリンパ球が他のリンパ球または内皮および他の非血管細胞に粘着することを可能する。細胞表面レセプター分子は相互に高度に関連することが判明している。リンパ球が上記の細胞表面レセプター分子を欠損しているヒトは慢性で再発性の感染症、および欠損抗体応答を含む他の臨床的症状を示す。リンパ球粘着は外来組織が認識され拒絶される過程で起るので、この過程の理解が臓器移植、組織移植、アレルギーおよび腫瘍学の分野において著しく価値がある。

【0006】

【発明の内容】細胞間粘着分子-1 (ICAM-1) およびその官能性誘導体に関する。さらにICAM-1の

機能を抑制し得る抗体および抗体フラグメント、およびICAM-1機能に対する他のインヒビター、並びにそのようなインヒビターを同定し得るアッセイに関する。さらに上記分子すべての診断および治療上の用途に関する。さらに詳細には、実質的に天然不純物を含まない細胞間粘着分子ICAM-1またはその官能性誘導体を包含する。さらにリンパ球表面に存在する分子に結合し得るそのような分子に関する。さらに検量可能に標識した細胞間粘着分子ICAM-1およびその誘導体に関する。

【0007】さらにICAM-1またはその官能性誘導体を発現し得る組換えDNA分子を包含する。また次の各工程を含む実質的に純粋な形でICAM-1を回収する方法を包含する：

(a) ICAM-1を発現する細胞膜からICAM-1を可溶化して、可溶性ICAM-1調製物を調製すること、(b) 上記可溶性ICAM-1調製物をICAM-1に結合し得る抗体を含有するアフィニティマトリックスに導入すること、(c) ICAM-1を上記アフィニティマトリックスの抗体に結合させること、(d) 上記マトリックスから抗体に結合し得ないすべての化合物を除去すること、および(e) ICAM-1を上記マトリックスから溶出させることによりICAM-1を実質的に純粋な形で回収すること。

【0008】さらにICAM-1およびICAM-1の官能性誘導体からなる群から選ばれた分子に結合し得る抗体を包含する。またそのような抗体を産生し得るハイブリドーマ細胞を包含する。さらにモノクローナル抗体R<sub>6</sub>-5-D<sub>6</sub>を産生し得るハイブリドーマ細胞を包含する。本発明は、次の工程を含む、ICAM-1に結合し得る抗体を産生する所望のハイブリドーマ細胞の産生方法に関する：

(A) 生理条件下で可溶であり、トランスメンブランドメインが欠落しており、ICAM-1細胞外ドメイン1〜5 (図8の残基1〜453) のアミノ酸配列を含有し、免疫学的反応性及び天然ICAM-1のICAM-1依存性粘着特性の仲介能力を保持しているヒトICAM-1の機能的フラグメントを発現する細胞で動物を免疫する工程、(B) 上記動物の臓細胞をミエローマ細胞系と融合させる工程、(C) 融合させた臓細胞及びミエローマ細胞により抗体分泌性ハイブリドーマ細胞を生成させる工程、及び(D) ハイブリドーマ細胞をICAM-1に結合し得る抗体を産生し得る所望のハイブリドーマ細胞にスクリーニングする工程。

【0009】更に上記工程(A)において、前記動物をICAM-1を発現するがLFA-1を発現しない細胞で免疫し、前記スクリーニング工程(D)が次の各工程：

(1) 前記ハイブリドーマ細胞のいずれかから産生した抗体を複数の凝集し得る細胞を含有するリンパ球調製物とインキュベートすること、(2) 上記産生した抗体を上記

リンパ球調製物の上記細胞の凝集を抑制する能力について検査すること、及び(3) 前記所望のハイブリドーマ細胞として、上記リンパ球調製物の上記細胞の凝集を抑制し得る抗体を産生するハイブリドーマ細胞を選択すること、を含むICAM-1に結合し得る抗体を産生する所望のハイブリドーマ細胞の産生方法も含有する。

【0010】また上記方法で取得したハイブリドーマ細胞およびそのハイブリドーマ細胞から産生させた抗体も包含する。本発明はまた細胞間粘着の非免疫グロブリンアンタゴニストの同定方法にも関し、その方法に次の工程よりなる：

(A) 細胞間粘着のアンタゴニストであり得る非免疫グロブリン剤を凝集可能な複数の細胞を含有するリンパ球調製物とインキュベートすること；および(B) 上記リンパ球調製物を検査して上記非免疫グロブリン剤の存在がリンパ球調製物の細胞凝集を抑制するかどうかを測定すること；凝集抑制が上記非免疫グロブリン剤を細胞間粘着のアンタゴニストとして同定する。

【0011】また哺乳動物の特異的防御システムの応答に由来する炎症を治療する方法にも関し、その方法はそのような治療の必要な対象物に上記炎症を抑制するのに十分な量の抗炎症剤を与えることを含み、かつこの抗炎症剤はICAM-1に結合し得る抗体、ICAM-1に結合し得る抗体のフラグメント、ICAM-1、ICAM-1の官能性誘導体、およびICAM-1の非免疫グロブリンアンタゴニストからなる群より選ばれる。さらにICAM-1の非免疫グロブリンアンタゴニストがLFA-1以外のICAM-1の非免疫グロブリンアンタゴニストである上述の炎症治療方法を包含する。また浸透にLFA-1群の官能性一員を必要とする造血腫瘍細胞の転移を抑制する方法にも関し、この方法はそのような治療を必要とする患者に上記の転移を抑制するのに十分な量の抗炎症剤を与えることを含み、かつこの抗炎症剤はICAM-1に結合し得る抗体、ICAM-1に結合し得る抗体のフラグメント、ICAM-1、ICAM-1の官能性誘導体、およびICAM-1の非免疫グロブリンアンタゴニストからなる群より選ばれる。

【0012】さらにICAM-1の非免疫グロブリンアンタゴニストがLFA-1以外の非免疫グロブリンアンタゴニストである上記造血腫瘍細胞の転移を抑制する方法も包含する。またICAM-1発現腫瘍細胞の成長を抑制する方法も包含し、その方法はそのような治療を必要とする患者に上記成長を抑制するのに十分な量の毒素を与えることを含み、この毒素はICAM-1に結合し得る毒素誘導抗体、ICAM-1に結合し得る抗体の毒素誘導フラグメント、LFA-1群分子の毒素誘導1員、およびLFA-1群分子の1員の毒素誘導官能性誘導体からなる群から選ばれる。またLFA-1発現腫瘍細胞の成長を抑制する方法にも関し、その方法はそのような治療を必要とする患者にかかる成長を抑制するの

十分な量の毒素を与えることを含み、この毒素は毒素誘導ICAM-1およびICAM-1の毒素誘導官能性誘導体からなる群より選ばれる。

【0013】さらに炎症を有する凝わしい哺乳動物対象体の特異的防御系の応答に由来する炎症の存在および位置を診断する方法に関し、その方法は、(a) 上記の対象体にICAM-1を発現する細胞を同定し得る検出可能に標識した結合性リガンドを含有する組成物を投与すること、および(b) 上記結合性リガンドを検出すること、を含む。さらに炎症を有する凝わしい哺乳動物対象体の特異的防御系の応答に由来する炎症の存在および位置を診断する方法に関し、その方法は、(a) 上記対象体の組織のサンプルをICAM-1を発現する細胞を同定し得る検出可能に標識した結合性リガンドを含有する組成物とインキュベートすること、および(b) 上記結合性リガンドを検出すること、を含む。

【0014】またICAM-1発現性腫瘍細胞を有する凝わしい哺乳動物対象体のそのような細胞の存在および位置を診断する方法にも関し、その方法は、(a) 上記対象体にICAM-1に結合し得る検出可能に標識した結合性リガンドを含有する組成物を投与すること、このリガンドは抗体およびICAM-1に結合し得る抗体フラグメントからなる群より選ばれること、および(b) 上記結合性リガンドを検出すること、を含む。またICAM-1発現性腫瘍細胞を有する凝わしい哺乳動物対象体のそのような細胞の存在および位置を診断する方法にも関し、その方法は(a) 上記対象体の組織のサンプルをICAM-1に結合し得る検出可能に標識した結合性リガンドを含有する組成物とインキュベートすること、このリガンドが抗体およびICAM-1に結合し得る抗体フラグメントからなる群より選ばれること、および(b) 上記結合性リガンドを検出すること、を含む。

【0015】またLFA-1群分子の1員を発現する腫瘍細胞を有する凝わしい対象体のそのような細胞の存在および位置を診断する方法にも関し、その方法は、(a) 上記対象体にLFA-1群分子の1員に結合し得る検出可能に標識した結合性リガンドを含有する組成物を投与すること、このリガンドはICAM-1およびICAM-1の官能性誘導体からなる群より選ばれること、および(b) 上記結合性リガンドを検出すること、を含む。またLFA-1群分子の1員を発現する腫瘍細胞を有する凝わしい対象体のそのような細胞の存在および位置を診断する方法にも関し、その方法は、(a) 上記対象体の組織のサンプルを分子のLFA-1群の1員に結合し得る検出可能に標識した結合性リガンドの存在下にインキュベートすること、このリガンドはICAM-1およびICAM-1の官能性誘導体からなる群より選ばれること、および(b) 上記組織サンプル中に存在する分子のLFA-1群の1員に結合している上記結合性リガンドを検出すること、を含む。

## 【0016】

【発明の実施の形態】1つの局面はLFA-1に対しての天然結合性リガンドの発見に関する。LFA-1群分子のような分子は、細胞間粘着の過程に含まれており、“粘着分子”と称されている。天然結合性リガンドは“細胞間粘着分子-1 (Intercellular Adhesion Molecule-1)”または“ICAM-1”と表示される。ICAM-1は76-97kdの糖たん白質である。ICAM-1はヘテロダイマーではない。本発明はICAM-1およびその“官能性誘導体”に関する。ICAM-1の“官能性誘導体”はICAM-1の生物学的活性に実質的に同様な生物学的活性(機能的または構造的に)を有する化合物である。“官能性誘導体”なる用語は分子の“フラグメント”、“変異体”、“同族体”または“化学誘導体”を包含するものとする。ICAM-1のような分子の“フラグメント”は分子の任意のポリペプチドサブセットを意味する。ICAM-1のような分子の“変異体”とは全分子またはそのフラグメントと構造上または機能上実質的に同様である分子を称する。分子は他の分子と両分子が実質的に同様な構造を有するかあるいは両分子が同様な生物学的活性を有する場合に“実質的に同様”と称される。即ち、2つの分子が同様な活性を有する場合、これらの分子は変異体であるとみなされ、該用語は本明細書において分子の1つの構造が他の分子中に見い出されない場合あるいはアミノ酸残基配列が同じでない場合でも使用される。本明細書で使用する時、分子が通常分子の1部でない追加の化学的部分を含む場合、その分子は他の分子の“化学的誘導体”であると称する。そのような部分は分子の溶解性、吸収性、生物学的半減期等を改善する。これらの部分はまた分子の毒性を低減させ、分子の望ましくない副作用等を消去または減衰させる。そのような作用を緩和させる部分は“Remington's Pharmaceutical Sciences (1980)”に記載されている。“毒素誘導”分子は“化学誘導体”の特別なクラスを構成している。“毒素誘導”分子は毒素部分を有する分子(ICAM-1または抗体のような)である。そのような分子の細胞への結合は細胞の極く近くに毒素部分を運びそれによって細胞死を促進する。任意の適当な毒素部分を使用できるが、例えば、リシン毒素、ジフテリア毒素、ラジオアイソトープ毒素、膜-チャンネル形成性毒素等の毒素を用いることが好ましい。そのような部分を分子に結合させる方法は当該技術において周知である。

【0017】ICAM-1または分子のLFA-1群の1員のような抗原性分子はリンパ球表面に天然に発現している。即ち、そのような細胞の適当な動物への腹腔内注射等によるような導入はICAM-1または分子のLFA-1群の1員に結合し得る抗体の産生をもたらすであろう。場合によっては、そのような動物の血清を取り出しこれら分子に結合し得るポリクローナル抗体の原料

として使用することもできる。しかしながら、好ましいのはそのような動物から脾臓球(spleno cytes)を取り出し、かかる脾臓細胞をミエロマ細胞系と融合させ、得られた融合細胞からICAM-1または分子のLFA-1群の各一員に結合し得るモノクローナル抗体を産生するハイブリドマ細胞を確立することである。上記の方法で得たハイブリドマ細胞はICAM-1または分子のLFA-1群のメンバーのいずれかに結合し得る抗体を産生する所望のハイブリドマ細胞を同定する種々の方法によってスクリーニングできる。1つの好ましいスクリーニングアッセイにおいては、そのような分子はそのエプスティーン-バーウイルス形質転換細胞の凝集を抑制する能力によって同定される。そのような凝集を抑制し得る抗体をさらにスクリーニングしてこれら抗体がそのような凝集をICAM-1または分子のLFA-1群の各一員への結合によって抑制したかどうかを決定する。ICAM-1を分子のLFA-1群から区別できる任意の手段をそのようなスクリーニングに用いることができる。例えば、抗体と結合した抗原は免疫沈降およびポリアクリルアミドゲル電気泳動によるようにして分析できる。結合抗原がLFA-1群の1員である場合には、免疫沈降した抗原がダイマーとして見い出されるであろうし、一方、結合抗原がICAM-1である場合には、単一分子量種が免疫沈降して来るであろう。また、分子のLFA-1群の1員に結合する抗体をICAM-1に結合する抗体からLFA-1を発現するがICAM-1は発現しない顆粒球のような細胞に結合する抗体の能力をスクリーニングすることによっても区別できる。顆粒球に結合する抗体(細胞凝集を抑制することが知られている)の能力はその抗体がLFA-1に結合し得ることを示す。そのような結合のない場合はICAM-1を認識し得る抗体を示し得る。顆粒球のような細胞に結合する抗体の能力は通常の熟練者により普通に用いられる方法によっても検出し得る。そのような方法にはイムノアッセイ、細胞凝集、フィルター結合試験、抗体沈降等がある。

【0018】本発明の抗凝集抗体はまたそのICAM-1を発現する細胞(活性化内皮細胞のような)に特異的に結合する能力およびそのICAM-1を発現しない細胞に結合し得ない能力を測定することによっても同定し得る。当業者によって容易に理解されるように、上記の各アッセイは修正して即ち、異なる順序で行って種々の可能性あるスクリーニングアッセイを提供でき、これらアッセイの各々はICAM-1に結合し得る抗体と分子のLFA-1群の各1員との間で同定および区別化を行い得るものである。抗炎症剤は、天然方法(例えば、動物、植物、真菌、バクテリア等をICAM-1の非免疫グロブリン アンタゴニストを産生するよう誘導することによってあるいは動物をICAM-1に結合し得るポリクローナル抗体を産生するよう誘導することによるよ

うな)により、合成方法〔例えば、ポリペプチド合成用のメリフィールド法を用いてICAM-1、ICAM-1の官能性誘導体またはICAM-1のたん白質アンタゴニスト(免疫グロブリンまたは非免疫グロブリンのいずれか)を合成することによるような)により、ハイブリドーマ技術(例えば、ICAM-1に結合し得るモノクローナル抗体を産生させるような)により、または組換え技術〔例えば、本発明の抗炎症剤を種々の宿主(例えば、酵母、バクテリア、真菌、培養動物細胞等)中で、あるいは組換えベクターまたはウィルスベクターから産生させるような)により得ることができる。用いる方法の選択は便宜さ、所望の収率等のファクターによる。上記の方法、手法または技術の1つのみを用いて特定の抗炎症剤を産生させる必要はなく、上記の方法、手法および技術は組合せて特定の抗炎症剤を得てもよい。

A. LFA-1結合用パートナー(ICAM-1)の同定

#### 1. LFA-1依存凝集のアッセイ

多くのエプスタイン・バーウイルス形質転換細胞は凝集を示す。この凝集はホルボールエステル存在下で促進できる。そのような同型(homotypic)の凝集(即ち、1種のみ細胞種を含む凝集)は抗LFA-1抗体によってブロックされることが見出された〔“Rothlein, R.等、J. Exper. Med. 163: 1132-1149 (1986)”、該文献は参考として本明細書に引用する〕。即ち、LFA-1依存性結合の度合は自発性またはホルボールエステル依存性凝集形成の度合を評価することによって決定できる。

【0019】LFA-1依存性凝集を干渉する試剤は該試剤がエプスタイン・バーウイルス形質転換細胞の自発またはホルボールエステル依存のいずれの凝集を抑制するかどうかを測定し得るアッセイを用いることによって同定できる。殆んどのエプスタイン・バーウイルス形質転換細胞はこれら細胞がLFA-1レセプター分子を発現し得る限りそのようなアッセイに用い得る。そのような細胞は“Springer, T.A.等、J. Exper. Med. 160: 1901-1918 (1984)”の方法によって調製できる。該文献は参考として本明細書に引用する。任意のそのような細胞を本発明のLFA-1依存性結合アッセイにおいて使用できるけれども、好ましいのはJY細胞系の細胞を使用することである〔Terhost, C. T.等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73: 910 (1976)〕。これらの細胞は任意の適当な培養地で培養できるが、最も好ましいのは10%ウシ胎児血清および50μg/mlのゲンタマイシン(ギブコラボラトリス社、ニューヨーク)を加えたRMP11640培地中で細胞を培養することである。これらの細胞は動物細胞増殖に適する条件(即ち、一般に37℃の温度で、5%CO<sub>2</sub>の雰囲気中で、95%の相対湿度にてなど)下で培養すべきである。

【0020】2. ICAM-1へのLFA-1の結合リンパ球がLFA-1レセプター分子の群を欠損するヒト個人は同定されている〔Anderson, D. C.等、Fed. Proc. 44: 2671-2677 (1985)；Anderson, D. C.等、J. Infect. Dis. 152: 668-689 (1985)〕。そのような人は白血球粘着欠損症(LAD)をこうむると云われている。そのような人のEBV形質転換細胞は上述の凝集アッセイにおいて自発またはホルボールエステル存在下のいずれにおいても凝集しない。そのような細胞をLFA-1発現性細胞と混合したときは、凝集が観察される〔Rothlein, R.等、J. Exper. Med. 163: 1132-1149 (1986)〕(図1)。重要なことは、これら凝集はこれらの細胞を抗LFA-1抗体の存在下でインキュベートした場合には形成されなかったことである。即ち、凝集はLFA-1を必要としたが、LFA-1欠損細胞のLFA-1含有細胞による凝集形成能力はLFA-1結合パートナーはLFA-1ではなくむしろ従来未発見の細胞間粘着分子であったことを示唆していた。第1図は細胞間粘着のメカニズムを示す。

#### B. 細胞間粘着分子-1(ICAM-1)

新規な細胞間粘着分子ICAM-1はRothlein, R.等の手順〔J. Immunol. 137: 1270-1274 (1986)、該文献は参考として本明細書に引用する〕によって最初同定され部分的に特徴付された。ICAM-1分子を検出するために、モノクローナル抗体をLFA-1発現が遺伝的に欠損しているヒトの細胞で免疫したマウスの脾臓細胞から調製した。得られた抗体をそのLFA-1発現細胞の凝集を抑制する能力についてスクリーニングした(図2)。詳しくは、マウスをLFA-1抗原を発現しないLAD患者からのEBV形質転換B細胞で免疫した。これら動物からの脾臓細胞を取り出し、ミエロマ細胞と融合させてモノクローナル抗体産生性ハイブリドーマ細胞になるようにした。次に、LFA-1を発現する正常人からのEBV形質転換B細胞を上記ハイブリドーマ細胞のモノクローナル抗体の存在下でインキュベートしてEBV形質転換B細胞のホルボールエステル媒介、LFA-1依存、自発性凝集を抑制し得る任意のモノクローナル抗体を同定した。ハイブリドーマ細胞はLFA-1抗原を全く含まない細胞から誘導したので、LFA-1に対するモノクローナル抗体は産生されなかった。従って、凝集を抑制することが判った抗体はいずれも、LFA-1ではないけれどもLFA-1粘着過程にかかわっていた抗原に結合し得るものでなければならない。そのようなモノクローナル抗体を取得する方法はいずれも使用できるけれども、好ましいのはBALB/CマウスをRothlein, R.等、(J. Immunol. 137: 1270-1274 (1986))により開示された経路およびスケジュールを用いてLFA-1欠損者からのエプスタイン・バーウイルス形質転換末梢血単核細胞

でもって免疫することによってICAM-1結合性モノクローナル抗体を得ることである。そのような細胞はSp ringer, T.A.等により開示されている〔J. Exper. Med. 160:1901-1918(1984)〕。

【0021】ICAM-1に結合し得る抗体の産生および検出のための好ましい方法においては、マウスはICAM-1およびLFA-1の両方を発現するEBV形質転換B細胞によりあるいはより好ましくはICAM-1を発現するがLFA-1を発現しないTNF活性化内皮細胞により免疫する。抗ICAM-1抗体を産生するハイブリドーマ細胞を調製する最も好ましい方法においては、Balb/cマウスをJY細胞および特異化U937細胞(ATCC CRL-1593)により順次免疫する。そのような動物からの脾臓細胞を取り出しミエローマ細胞と融合させ抗体産生性ハイブリドーマ細胞に発展させる。得られた抗体をそのLFA-1およびICAM-1の両方を発現するJY細胞のようなEBV形質転換細胞系のLFA-1依存、ホルボールエステル誘起凝集を抑制する能力についてスクリーニングする。Rothlein, R.等〔J. Immunol. 137:1270-1274(1987)〕により開示されているように、そのような凝集を抑制し得る抗体をSKW<sub>3</sub>〔Dustin, M.等, J. Exper. Med. 165:672-692(1987)、ホルボールエステルの存在下で自発的に凝集するその能力はLFA-1に結合し得る抗体によっては抑制されるが抗ICAM-1抗体によっては抑制されない〕のような細胞系のホルボールエステル誘起凝集を抑制する能力について試験する。JY細胞のような細胞のホルボールエステル誘起凝集を抑制し得るがSKW<sub>3</sub>のような細胞のホルボールエステル誘起凝集を抑制し得ない抗体は恐らく抗ICAM-1抗体である。また、ICAM-1に結合し得る抗体は、LFA-1発現性細胞(JY細胞のような)のLFA-1依存性凝集を抑制し得るがLFA-1を発現するがICAM-1を殆んどまたは全く発現しない細胞(正常顆粒状のような)に結合し得ない抗体あるいはICAM-1を発現するがLFA-1を発現しない細胞(TNF活性化内皮細胞のような)に結合し得る抗体のスクリーニングによっても同定し得る。別の方法はICAM-1、LFA-1または両方を発現する細胞からJY細胞のような細胞のLFA-1依存性凝集を抑制する抗体を用いSDS-PAGEにより免疫沈降させることであり、あるいは等価の方法により抗体により沈降した分子のいくつかの分子特性を測定する。その特性がICAM-1の特性と同じであるならば、その抗体は抗ICAM-1抗体であるとみなし得る。

【0022】上述の方法で調製したモノクローナル抗体を用いて、ICAM-1細胞表面分子を精製し特性付した。ICAM-1はヒト細胞または組織からモノクローナル抗体アフィニティークロマトグラフィーを用いて精製した。そのような方法においては、ICAM-1と反

応性のモノクローナル抗体を不活性カラムマトリックスに結合させる。そのような結合を行う任意の方法を使用できるが、好ましいのは“Oettgen, H. C.等, J. Biol. Chem. 259:12034(1984)”の方法を用いることである。細胞溶解物を上記マトリックスに通したとき、存在するICAM-1分子はマトリックスに吸着され保存される。カラムのpHまたはイオン濃度を変えることにより、結合したICAM-1分子はカラムから溶出し得る。任意の適当なマトリックスを使用できるけれども、好ましいのはマトリックス材料としてセファローズ(ファルマシア)を用いることである。カラムマトリックスの作製およびそのたん白質精製での使用は当該技術において周知である。

【0023】当業者によって理解された方法において、上述のアッセイ法を用いて細胞粘着の速度または程度を減衰しあるいは抑制し得る化合物を同定することができる。ICAM-1は血管内皮細胞、胸腺上皮細胞、ある種の他の上皮細胞、および繊維芽球のような非造血細胞上並びに組織マクロファージ、マイトジェン刺激Tリンパ芽球、へん桃腺内の胚中心B細胞および樹枝状細胞、リンパ節、およびバリエル板のような造血細胞上に発現した細胞表面糖たん白質である。ICAM-1はリンパ節および反応性増殖を示すへん桃腺内のT細胞領域の血管内皮細胞状に高度に発現される。ICAM-1は末梢血リンパ球上に少量発現される。ある骨髄単球細胞系のホルボールエステル刺激特異化はICAM-1発現を大きく増大させる。即ち、ICAM-1は炎症部位に優先的に発現され静止状態の細胞には一般に発現されない。皮ふ繊維芽球上のICAM-1発現は10μg/mlのレベルのインターロイキン1またはガンアーインターフェロンによりそれぞれ4時間または10時間以上で3倍〜5倍増大する。その誘発はたん白質およびmRNA合成に依存し可逆的である。

【0024】ICAM-1は繊維芽球上での97kd、骨髄単球細胞系上での114kd、およびBリンパ芽球細胞JY上での90kdの分子量を有する細胞種での分子量異種抗原性を示す。ICAM-1生合成は約73kdの細胞間プレカーサーを含むことが判っている。ツニカマイシン処理から得られる非-N-グリコシル化形は分子量55kdを有する。ホルボールエステル刺激U937細胞からあるいは繊維芽球細胞から単離したICAM-1は化学脱グリコシル化後同一の主要生成物を与える。ICAM-1モノクローナル抗体はフィトヘマグルチニン芽球のLFA-1欠損細胞系への粘着を干渉する。繊維芽球のICAM-1に結合したモノクローナル抗体による前処理(リンパ球は行わない)リンパ球-繊維芽球粘着を抑制する。リンパ球のLFA-1に対する抗体による前処理(繊維芽球は行わない)もリンパ球-繊維芽球粘着を抑制することが見い出されている。

【0025】従って、ICAM-1は白血球上のCD1



8複合体の結合性リガンドである。ICAM-1はIL-1、ガンマインターフェロンおよび腫瘍壊死因子のような炎症メディエーターによりインビトロで繊維芽球および内皮細胞上にインビボでの炎症領域中へのリンパ球の浸潤と時間的に一致して誘起可能である〔Dustin, M.L.等、*J. Immunol.*, **137**: 245-254、(1986) ; Prober, J.S.等、*J. Immunol.*, **137**: 1893-1896、(1986)〕。さらに、ICAM-1は血管内皮細胞、胸腺上皮細胞、他の上皮細胞および繊維芽球のような非造血細胞上にまた組織マクロファージ、マイトジェン刺激Tリンパ芽球、へん桃腺内の胚中心B細胞および樹枝状細胞、リンパ節およびパイエル板のような造血細胞上にも発現される〔Dustin, M.L.等、*J. Immunol.*, **137**: 245-254、(1986)〕。ICAM-1はアレルギー性湿疹、扁平苔癬、発疹、じんま疹および水疱性疾患のような良性炎症のケラチノサイト上にも発現される。アレルギー性である患者の皮膚へのハプテンの適用により誘発させたアレルギー性皮膚反応もケラチノサイト上に多量のICAM-1発現を生じた。これに対して、皮膚上の有毒パッチはケラチノサイト上にICAM-1発現を生じなかった。ICAM-1は種々の皮膚学上の不整からの皮膚傷害の生検からのケラチノサイト上に存在し、ICAM-1発現はアレルギーパッチ試験からの傷害において誘発され毒性パッチ試験傷害からのケラチノサイトはICAM-1を発現しない。ICAM-1は、従って、リンパ球が付着できる細胞基質であり、その結果、リンパ球は炎症部位に浸透し得および/またはこの炎症に貢献する各種のエフェクター機能を伝達し得る。そのような機能には抗体の産生、ウィルス感染ターゲット細胞の溶解等がある。本明細書で使用する“炎症”なる用語は特異的防御系の反応のみを含むことを意味する。“特異的防御系”なる用語は特異的抗原の存在と反応する免疫系の成分を称するものとする。炎症は、特異的防御系の反応により生じ、媒介されあるいはそれに伴う場合には、特異的防御系の応答に由来するものといわれている。特異的防御系の応答に由来する炎症の例には風疹ウィルス、自己免疫疾患、T細胞によって仲介された遅延型過敏症(例えば、Mantoux 試験で“陽性”となる患者におけるような)等がある。

#### C. ICAM-1遺伝子のクローニング

任意の多くの方法を用いてICAM-1遺伝子をクローニングできる。そのような方法の1つはICAM-1遺伝子を含む挿入物の存在についてcDNA挿入物のシャトルベクターライブラリー(ICAM発現性細胞由来の)を分析することである。そのような分析は細胞を上記ベクターで移入し次いでICAM-1発現についてアッセイすることによって実施できる。この遺伝子をクローニングする好ましい方法はICAM-1分子のアミノ酸配列を決定することが必要である。これを行うに

は、ICAM-1たん白質を精製して自動化シークエーターにより分析できる。また、分子は臭化シアンによりあるいはパパイイン、キモトリプシンまたはトリプシンのようなプロテアーゼによるようにして分解できる〔Oike, Y.等、*J. Biol. Chem.*, **257**: 9751-9758 (1982) ; Liu, C.等、*Int. J. Pept. Protein Res.*, **21**: 209-215 (1983)〕。ICAM-1の全アミノ酸配列を決定できるけれども、好ましいのは分子のペプチドフラグメントの配列を決定することである。ペプチドが10ヶのアミノ酸より長い場合、その配列情報は一般にICAM-1の遺伝子のような遺伝子をクローニングするのに十分である。

【0026】ペプチド中のアミノ酸残基の配列は、普通用いられている3文字表示または1文字表示を用いて本明細書においても表示する。これら3文字および1文字表示の目録は“Biochemistry, Lehninger, A., Worth Publishers刊、ニューヨーク、(1970)”のような教科書において見出しされる。そのような配列を縦に書くときには、アミノ末端基は列の頂部にあるようにし、カルボキシ末端基は列の底部にあるようにする。同様に、横方向に書くときには、アミノ末端は左にあるようにし、カルボキシ末端は右末端にあるようにする。ペプチド中のアミノ酸残基はハイホンによって分離できる。そのようなハイホンは単に配列の存在を容易にすることを意図しているだけである。単なる例示としては、

-Gly-Ala-Ser-Phe-

と表示したアミノ酸配列はAla残基がGlyのカルボキシ基に結合していることおよびSer残基がAla残基のカルボキシ基およびPhe残基のアミノ基に結合していることを示している。この表示はさらにアミノ酸配列がテトラペプチド-Gly-Ala-Ser-Phe-を含有していることも示している。この表示はアミノ酸配列をこの1つのテトラペプチドに限定するものではないが、(1)アミノまたはカルボキシに結合した1種以上のアミノ酸残基を有するテトラペプチド、(2)アミノおよびカルボキシ末端の両方に結合した1種以上のアミノ酸残基を有するテトラペプチド、(3)追加のアミノ酸残基を有していないテトラペプチドを包含するものとする。

【0027】1種以上の適当なペプチドフラグメントがシーケンシングされると、これらをコードし得るDNA配列を検査する。遺伝子コードは縮重するので、1種以上のコドンを用いて特定のアミノ酸をコードできる〔Watson, J. D., *Molecular Biology of the Gene*, 第3版、W. A. Benjamin社、カルホルニアメンローパーク、(1977)、pp356-357〕。ペプチドフラグメントを分析して最低度の縮重性を有するオリゴヌクレオチドによってコードされ得るアミノ酸配列を同定する。これは好ましくは単一コドンのみによってコードされているアミノ酸を含有する配列を同定することによって行



う。場合によっては、そのようなアミノ酸配列は単一オリゴヌクレオチドのみによってコードされ得るので、多くの場合、そのアミノ酸配列は任意の1セット(組)の同様なオリゴヌクレオチドによってコードされ得る。重要なのは、上記セットのすべてのメンバーがそのペプチドフラグメントをコードし得るオリゴヌクレオチドを含有し、かくしてそのペプチドフラグメントをコードする遺伝子として同じヌクレオチド配列を潜在的に含むのに対し、上記のセットの1メンバーのみはこの遺伝子のヌクレオチド配列と同一のヌクレオチド配列を含むことである。このメンバーは上記のセット内に存在し、上記セットの他のメンバーの存在においてさえもDNAにハイブリッドし得るので、単一オリゴヌクレオチドを用いて上記ペプチドをコードする遺伝子をクローニングするのと同じ方法で分解していないオリゴヌクレオチドセットを用いることができる。

【0028】上述の方法と正確に同じ方法において、ペプチドフラグメントをコードし得るオリゴヌクレオチド配列または配列セットに相補的であるヌクレオチド配列を有するオリゴヌクレオチド(またはオリゴヌクレオチドのセット)を用い得る。ICAM-1遺伝子のフラグメントをコードし得る適当なオリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドのセット(またはそのようなオリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドに相補性であるもの)を同定し(上述の手順を用いて)、DNAについて当該技術で周知の手段を用いて、好ましくはICAM-1遺伝子配列を発現し得るヒト細胞由来のcDNA調製物により合成しハイブリッド化する。核酸ハイブリッド化技術はManiatis, T.等、により“Molecular Cloning, a Laboratory Manual”, Cold Spring Harbor, NY (1982)”において、またHaymes, B. D.等により“Nucleic acid Hybridization, a Practical Approach”, IRL Press社、ワシントンD. C. (1985)”において開示されており、これら文献は参考として本明細書に引用する。使用するDNAまたはcDNA源は好ましくはICAM-1配列に富む。そのような濃厚化はICAM-1合成を誘起する条件下で培養された細胞(ホルボールエステル存在下で増殖させたU937等のような)からRNAを抽出することによって得たcDNAから最も容易になし得る。

【0029】上述した方法のようなあるいは同様な方法はヒトアルデヒドデヒドロゲナーゼの遺伝子[Hsu, L. C.等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 3771-3775 (1985)]、フィブロネクチン[Suzuki, S.等、Eur. Mol. Biol. Organ. J. 4: 2519-2524 (1985)]、ヒトエストロゲンレセプター遺伝子[Walter, P.等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 7889-7893 (1985)]、組織型プラスミノゲンアクチベーター[Pennica, D.等、Nature 301: 214-221 (1983)]および

ヒト胎盤アルカリホスファターゼ相補DNA[Kam, W.等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 8715-8719 (1985)]のクローニングを可能にしている。ICAM-1遺伝子をクローニングする別の好ましい方法においては、発現ベクターのライブラリーをICAM-1を発現ベクター中に発現できる細胞からDNAまたは好ましくはcDNAをクローニングすることによって調製する。このライブラリーを次いで抗ICAM-1抗体に結合しICAM-1またはICAM-1フラグメントと同じアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードし得るヌクレオチド配列を有するたん白質を発現し得るメンバーについてスクリーニングする。

【0030】上記方法により得られるクローニングICAM-1遺伝子は操作によって発現ベクターに結合させバクテリアまたは真核生物細胞に組み込んでICAM-1たん白質を産生させる。そのような操作技術はManiatis, T.等(前出)により開示され、当該技術において周知である。

#### D. LFA-1依存性凝集のアッセイの使用

LFA-1依存性凝集を測定し得る前述のアッセイを用いてLFA-1依存性凝集の度合を抑制するアンタゴニストとして作用する試剤を同定できる。そのようなアンタゴニストは凝集に関係するLFA-1またはICAM-1の能力を付与することによって作用し得る。即ち、そのような試剤はLFA-1またはICAM-1に結合し得る抗体のような免疫グロブリンを包含する。さらに、非免疫グロブリン(即ち、化学)剤も、上記アッセイを用いてこれらがLFA-1凝集のアンタゴニストであるかどうかを決定し得る。

#### E. ICAM-1レセプターたん白質に結合し得る抗体の使用

##### 1. 抗炎症剤

CD18複合体の各1員に対するモノクローナル抗体は内皮への結合[Haskard, D.等、J. Immunol. 137: 2901-2906 (1986)]、ホモタイプ粘着[Rothlein, R.等、J. Exp. Med. 163: 1132-1149 (1986)]リンパ球の抗原およびマイトジェン誘起増殖[Davignon, D.等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 4535-4539 (1981)]、抗体形成[Fisher, A.等、J. Immunol. 136: 3198-3203 (1986)]、および細胞毒性T細胞[Krensky, A. M.等、J. Immunol. 132: 2180-2182 (1984)]、マクロファージ[Strassman, G.等、J. Immunol. 136: 4328-4333 (1986)]、および抗体依存性細胞毒反応に含まれるすべての細胞[Kohi, S.等、J. Immunol. 133: 2972-2978 (1984)]の溶解活性のようなすべての白血球のエフェクター機能を包含する白血球の多くの粘着依存性機能を抑制する。これら機能のすべてにおいて、上記抗体は白血球の適当な細胞基質への粘着能力(ここ

の能力は最終結果を抑制する)を抑制する。

【0031】前述したように、ICAM-1分子のLFA-1群分子の1員への結合は細胞粘着において極めて重要である。粘着の過程において、リンパ球は外来抗原の存在について動物を連続的にモニターし得るものである。これらの過程は通常は望ましいものであるけれども、これらの過程はまた臓器移植拒絶、組織移植拒絶、および多くの自己免疫疾患の原因でもある。従って、細胞粘着を減衰または抑制できる何らかの手段が臓器移植、組織移植または自己免疫患者の受け入れ者に大いに望まれている。ICAM-1に結合し得るモノクローナル抗体は哺乳動物の抗炎症剤として極めて適している。明らかに、そのような薬剤は粘着を選択的に抑制でき通常の薬剤で見出し得るネフロ毒性のような他の副作用を示さない点で一般の抗炎症剤と異なっている。従って、ICAM-1に結合し得るモノクローナル抗体を用いて哺乳動物においてそのような副作用の恐れなしに臓器または組織の拒絶反応を防止しあるいは自己免疫応答を修正できる。

【0032】重要なことは、ICAM-1を認識し得るモノクローナル抗体の使用はHLA不均衡を有する個々人間においてさえも臓器移植を行うことができるということである。

## 2. 遅延型過敏反応のサブレッサー

ICAM-1分子は殆んど遅延型過敏反応に含まれる部位のような炎症部位に発現するので、ICAM-1分子に結合し得る抗体(特にモノクローナル抗体)はそのような反応の減衰または排除において治療的潜在力を有する。この潜在的治療用途は2つの方法のいずれかで活用できる。第1は、ICAM-1に対するモノクローナル抗体を含有する組成物を遅延型過敏反応を呈する患者に投与できる。例えば、そのような組成物は毒キツダ、毒オーク等の抗原と接触した人に投与できるであろう。第2の態様においては、ICAM-1に結合し得るモノクローナル抗体を抗原と共に患者に投与してその後の炎症反応を防止する。即ち、抗原とICAM-1結合性モノクローナル抗体との共投与は人をその後の上記抗原の出現を一時的に許容し得る。

## 【0033】3. 慢性炎症疾患の治療

LFA-1を欠損するLAD患者は炎症応答を示さないもので、LFA-1の天然リガンド、ICAM-1の拮抗作用もまた炎症応答を抑制するものと信じている。ICAM-1に対する抗体の炎症を抑制する能力は円板状エリスマトーデス、自己免疫甲状腺炎、実験的アレルギー性脳脊髄炎(EAE)、多発性硬化症、糖尿病レイナード症候群のある態様、リウマチ様関節炎等の慢性炎症および自己免疫疾患の治療における治療用途の基本を与える。一般に、ICAM-1に結合し得るモノクローナル抗体はステロイド療法により現在治療可能な疾患の治療に用い得る。

## 4. 診断および判定的用途

ICAM-1は殆んど炎症部分に発現するので、ICAM-1に結合し得るモノクローナル抗体は患者の感染および炎症部位を画像化または可視化する手段として使用できる。そのような用途においては、モノクローナル抗体はラジオアイソトープ、アフィニティラベル(ビオチン、アビジン等のような)、蛍光ラベル、常磁性原子等の使用により検出可能に標識化する。そのような標識化を行う手順は当該技術において周知である。画像診断における抗体の臨床的応用は“Grossman, H. B., *Urol, Clin, North Amer.* 13:465-474(1986)”、“Unger, E. C.等、*Invest, Radiol.* 20:693-700(1985)”および“Khaw, B. A.等、*Science* 209:295-297(1980)”により検討されている。

【0034】炎症の存在はまたICAM-1を発現する細胞のICAM-1遺伝子配列にまたはICAM-1 mRNA配列に結合するmRNA、cDNAまたはDNAのような結合性リガンドの使用によっても検出できる。そのようなハイブリッド化アッセイを行う技術は Maniatis, T. (前出)によって開示されている。そのような検出可能に標識した抗体の病巣の検出は炎症または腫瘍発現部位を示し得る。1つの実施態様においては、この炎症検査は組織または血液のサンプルを取り出しそのようなサンプルを上記検出可能に標識した抗体の存在下にインキュベートすることによって行う。好ましい実施態様においては、この方法を磁性画像診断、フルオログラフィ等を用いて非侵略的方法で行う。そのような診断試験は臓器移植受け入れ者を潜在的な組織拒絶の早期発見のためにモニターするのに用い得る。そのようなアッセイはまたリウマチ様関節炎または他の慢性炎症疾患に対する個々人の対応を決定するにも実施し得る。

## 【0035】5. 治療または診断目的で投与する抗原物質の導入の補佐

例えば、ウシインシュリン、インターフェロン、組織型アラズミノゲンアクチベーターまたはマウスモノクローナル抗体のような治療または診断剤への免疫応答はそのような薬剤の治療または診断価値を実質的に減少させ、実際に、血清病のような疾患を生ずる。そのような事情は抗体を用いて改善できる。この実施態様においては、そのような抗体を治療剤または診断剤と組合せて投与する。抗体の添加は受け入れ者を上記薬剤の認識から防止し、従って、受け入れ者が薬剤に対する免疫応答を開始するのを防止する。そのような免疫応答がないことは患者の治療剤または診断剤の追加の投与を受け入れる能力をもたらす。

## F. 細胞間粘着分子-1(ICAM-1)の使用

ICAM-1はLFA-1の結合パートナーである。かくして、ICAM-1またはその官能性誘導体は患者の治療においてLFA-1に結合し得る抗体と相互変化的

に使用できる。即ち、可溶化形において、そのような分子は炎症、臓器拒絶、移植拒絶等を抑制するのに用い得る。ICAM-1またはその官能性誘導体は抗ICAM抗体と同じ方法で用いて治療剤または診断剤の免疫原性を減少させ得る。

【0036】ICAM-1、その官能性誘導体、およびそのアンタゴニストを用いて表面上にICAM-1またはLFA-1を発現する腫瘍細胞の転移または増殖をブロックし得る。種々の方法がそのような目的を達成するのに用い得る。例えば、造血細胞の浸透はLFA-1-ICAM-1結合を必要とする。従って、そのような結合のアンタゴニストは上記の浸透を抑制し白血球由来の腫瘍細胞の転移をブロックする。また、ICAM-1またはLFA-1群分子の1員に結合し得る毒素誘導分子も患者に投与し得る。そのような毒素誘導分子がICAM-1またはLFA-1群分子の1員と結合する場合、毒素の存在が腫瘍細胞を殺しそれによって腫瘍の増殖を抑制する。

#### G. ICAM-1依存性粘着の非免疫グロブリンアンタゴニストの使用

ICAM-1依存性粘着はICAM-1またはLFA-1に結合し得る非免疫グロブリンアンタゴニストにより抑制し得る。LFA-1の非免疫グロブリンアンタゴニストの1つの例はLFA-1である。LFA-1に結合する非免疫グロブリンアンタゴニストの例はICAM-1である。前述のアッセイを使用することによって、追加の非免疫グロブリンアンタゴニストを同定し精製できる。ICAM-1依存粘着の非免疫グロブリンアンタゴニストはLFA-1に対する抗体またはICAM-1に対する抗体と同じ目的で使用できる。

#### H. 本発明の組成物の投与

ICAM-1の治療効果は患者に全ICAM-1またはその任意の治療上活性なペプチドフラグメントを投与することによって得られる。

【0037】ICAM-1およびその官能性誘導体は組換えDNAを用いて合成的にあるいはたん白質分解により取得できる。ICAM-1の治療上の利点は追加のアミノ酸残基を有してキャリアーに対する結合性を改善しあるいはICAM-1の活性を改善したICAM-1の官能性誘導体の使用により増強され得る。さらにある種のアミノ酸残基を欠損しあるいは別のアミノ酸残基を含むICAM-1の官能性誘導体もそのような誘導体が細胞粘着に作用する能力を示す限り包含するものとする。抗体およびICAM-1分子は、これらを含む調製物がこれらの生成物と共に通常天然に見出される物質を実質的に含まない場合、“天然不純物を実質的に含まない”といえる。

【0038】ICAM-1に結合し得る抗体およびその生物学的活性を有するフラグメント（ポリクローナルまたはモノクローナル）にも及ぶ。患者にICAM-1に

結合し得る抗体またはそのフラグメントを投与するには、あるいは、ICAM-1（またはそのフラグメント、変異体または誘導体）を患者に投与するには、その投与量は患者の年齢、体重、身長、性別、一般的医療条件、病歴等のファクターによる。一般には、患者に約1Pg/kg～10mg/kg（患者体重）の範囲の抗体投与量で投与することが望ましいが、それより低量または高量の投与量も投与できる。ICAM-1分子またはその官能性誘導体を患者に投与するときは、同じく約1Pg/kg～10mg/kg（患者の体重基準）の範囲の投与量でそのような分子を投与することが好ましいが、それより低量または高量の投与量も使用できる。後述するように、上記の有効投与量は抗ICAM-1抗体を抗LFA-1投与と共投与する場合は少なくすることができる。2種の抗体（またはその官能性誘導体）はこれらがこれら両化合物を患者血清中に検出できるような時間条件で投与される場合において患者に共投与できると云える。

【0039】ICAM-1に結合し得る抗体及びICAM-1自体の両者は患者に静注、筋注、皮下、腸内または非経口的に投与できる。抗体またはICAM-1を注射により投与するときは、投与は連続注入によりあるいは1回または多数回ボラスにより行い得る。抗炎症剤は炎症を抑制するのに十分な量で受け入れ対象体に投与するものである。その量は、薬剤の投与量、投与経路等が炎症を減衰させあるいは防止するに十分である場合において炎症を“抑制”するに十分であると云える。抗炎症剤は炎症の発症前（予想される炎症を抑制するために）または炎症発症後のいずれにおいても投与できる。組成物はその投与が受け入れ患者に許容される場合に“薬学上受け入れ可能である。”と云える。そのような薬剤はその投与量が生理学上有意である場合に“治療上有効な量”で投与されると云える。薬剤はその存在が受け入れ患者の生理に検知可能な変化をもたらす場合に生理学上有意である。抗体およびICAM-1分子は薬学上有用な組成物を調製する公知の方法によって処方でき、それによってこれらの物質またはその官能性誘導体を薬学上許容できるキャリアーベヒクルと混合物として組合せ得る。適当なベヒクルおよびその調製物（例えば、他のヒトたん白質、例えば、ヒト血清アルブミンを含む）は、例えば、“Remington's Pharmaceutical Sciences（第16版、Dsol, A.編、マーク イーストン（PA）、（1980）”に記載されている。有効な投与に適する薬学上許容し得る組成物を調製するためには、そのような組成物は適当量のキャリアーベヒクルと共に有効量の抗ICAM-1抗体またはICAM分子、またはその官能性誘導体を含む。

【0040】追加の薬学的方法を用いて活性の持続を制御することができる。制御放出性製剤は抗ICAM-1抗体またはICAM-1、またはこれらの官能性誘導体を複合体化しあるいは吸収するポリマーを使用すること

によって得ることができる。制御された伝達は適当なマクロ分子(例えば、ポリエステル、ポリアミノ酸、ポリビニルピロリドン、エチレン-酢酸ビニル、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、またはプロタミン硫酸塩)および該マクロ分子の濃度並びに放出を制御するための混入方法を選択することによって達成できる。制御放出製剤により活性持続を制御するもう1つの可能性ある方法は抗ICAM-1抗体またはICAM-1分子、またはこれらの官能性誘導体をポリエステル、ポリアミノ酸、ヒドロゲル、ポリラクトン酸またはエチレン-酢酸ビニルコポリマーのような高分子物質の粒子に混入させることである。また、これら薬剤を高分子粒子に混入させる代りに、これらの薬剤を例えばコアセルベーション法によりあるいは界面重合法により調製したマイクロカプセル例えばヒドロキシメチルセルロースまたはゼラチンマイクロカプセルおよび(メチルメタクリレート)マイクロカプセル中に、あるいはコロイド状薬物伝達系例えばリボソーム、アルブミンマイクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノパーティクル、ナノカプセルまたはマクロエマルジョン中に内包させることも可能である。そのような方法も“Remington's Pharmaceutical Sciences (1980)”中に記載されている。

#### 【0041】

【実施例】これまで本発明を一般的に説明して来たが、以下の実施例は本発明をより容易に理解できるであろう。これらの実施例は例示を目的とするものであり本発明を限定するものではない。

#### 実施例1

##### 動物細胞の培養

一般に、本発明のEBV形質転換およびハイブリドーマ各細胞は20mMのL-グルタミン、50 $\mu$ g/mlのジェンタマイシン、および10%のウシ胎児血清を加えたRPMI 1640培地中に保存した。細胞は37℃で、5%CO<sub>2</sub>、95%湿度雰囲気下で培養した。

【0042】エプスタイン-バーウイルス(EBV)形質転換体を確立するために、20%ウシ胎児血清(FCS)および50 $\mu$ g/mlのジェンタマイシンを加えたRPMI 1640培地中の10<sup>6</sup>個のT細胞放血末梢単核細胞/mlを16時間B95-8細胞のEBV含有上清でインキュベートした[Thorley-Lawson, D. A. 等、*J. Exper. Med.* 146:495(1977)]。0.2ml中細胞アリコートをして10マイクロタイターウェルに入れた。培地をRPMI 1640培地(20%ウシ胎児血清および50 $\mu$ g/ml ジェンタマイシンを加えた)で細胞増殖がみられるまで置換えた。細胞は殆んどウェルで増殖し同じ培地中に拡散した。フィトヘマグルチニン(PHA)芽球を1:800希釈PHA-P(Difco Laboratories社、デトロイト、MI)を含有するRPMI 1640培地(20%ウシ胎児血清)中10<sup>6</sup>細胞/mlで確立した。PHA系はインターロイキン2(IL-2)調整培

地で拡がりPHAにより弱く脈動した[Cantrell, D. A. 等、*J. Exper. Med.* 158:1895(1983)]。上記手順は“Springer, T. 等、*J. Exper. Med.* 160:1901-1918(1984)”により開示されており、その記載は参考として本明細書に引用する。上記手順で得た細胞を次いで抗LFA-1抗体でスクリーニングしてこれらがLFA-1抗原を発現するかどうかを決定した。そのような抗体は“Sanchez-Madrid, F. 等、*J. Exper. Med.* 158:1785(1983)”に開示されている。

#### 【0043】実施例2

##### 細胞凝集および粘着のアッセイ

細胞粘着の度合を評価するために、凝集アッセイを用いた。かかるアッセイに用いた細胞系は5mMのHepesバッファー(Sigma Chemical社、セントルイス)を含有するRPMI 1640培地で2回洗浄し2 $\times$ 10<sup>6</sup>細胞/mlの濃度に再懸濁させた。平底96ウェルマイクロタイタープレート(No. 3596; Costar社、ケンブリッジ、MA)に50 $\mu$ lの適当なモノクローナル抗体上清、50 $\mu$ lの精製モノクローナル抗体を含むまたは含まない完全培地、50 $\mu$ lの200ng/mlホルボールエステルホルボールミリステートアセテート(PMA)含有完全培地および100 $\mu$ lの完全培地中2 $\times$ 10<sup>6</sup>細胞/ml濃度の細胞を加えた。細胞を自然に沈降させ、凝集度を各時点で計数した。度数は0~5+の範囲にあった。ここで0は密集中に本質的に細胞がないことを示し; 1+は10%以下の細胞が凝集物中にあり; 2+は50%以下の細胞が凝集していることを示し; 3+は100%までの細胞が小さいゆるやかな密集中にあったことを示し; 4+は100%までの細胞が大密集中に凝集したことを示し; 5+は100%の細胞が大きい極めて密な凝集物中にあったことを示す。細胞粘着のより定量的な評価を得るために、試剤および細胞を上記と同じ順序で5mlポリスチレンチューブに加えた。チューブを37℃でグリマトリーシェーカー上の台中に置いた。約200rpmで1時間後に、10 $\mu$ lの細胞懸濁液をヘモサイトメーター中に入れ遊離細胞の数を定量した。%凝集を次の等式によって決定した。

$$\%凝集 = 100 \times (1 - \text{遊離細胞の数} / \text{入れた細胞の数})$$

上記等式中の入れた細胞の数はインキュベートしていない細胞と完全培地のみを含有するコントロールチューブ中のml当りの細胞数である。上記等式中の遊離細胞の数は試験チューブからのml当りの非凝集細胞の数に等しい。上記の手順は“Rothlein, R. 等、*J. Exper. Med.* 163:1132-1149(1986)”によって開示されている。

#### 【0044】実施例3

##### LFA-1依存性凝集

実施例2で記載した定量的凝集アッセイをエプスタイン

ーバールウィルス形質転換細胞系JYを用いて行った。マイクロタイター中の培地にPMAを加えて、細胞凝集を観察した。時間経過ビデオ記録計はマイクロタイターウェル底部のJY細胞が動いており活性な膜波動および仮足運動を示していた。隣接細胞の仮足間の接触はしばしば細胞-細胞粘着をもたらした。粘着が持続した場合、細胞接触領域は尾脚(uropod)に移動した。接触は激しい細胞運動および双対方向への細胞の引っ張り合いにも依らず維持できた。PMA処理および未処理細胞間の主な違いは1度形成された上記接触の安定性において現われていた。PMAにおいては、細胞密集が出現し、その周りに粘着した追加の細胞として粒度の成長があった。

【0045】粘着を測定する第2の手段としては、実施例2で記載した定量的アッセイを用いた。細胞懸濁液を2時間、200rpmで振り、ヘモサイトメーターに移し、凝集物中に含まれない細胞を計数した。PMAの不存在では、42%(SD=20%, N=6)のJY細胞が2時間後、凝集物中にあったが、50 $\mu$ g/mlのPHAと共に同じ条件下でインキュベートしたJY細胞は凝集物中に87%(SD=8%, N=6)の細胞を有していた。凝集の動力学的検討はPMAがすべての試験時間で凝集速度および強度を促進していることを示した(図3)。

#### 実施例4

抗LFA-1モノクローナル抗体を用いての細胞の凝集抑制

PMA誘起細胞凝集への抗LFA-1モノクローナル抗体の効果を試験するために、そのような抗体を実施例2の定量凝集アッセイに従ってインキュベートした細胞に加えた。このモノクローナル抗体はPMAの存在または不存在下のいずれにおいても細胞凝集の形成を抑制していることが判った。LFA-1のアルファ鎖に対するモノクローナル抗体のF(ab')<sub>2</sub>およびFab'フラグメントの2つは細胞凝集を抑制できた。一方、本質的に100%の細胞が抗LFA-1抗体の不存在下では凝集を形成し、抗体を加えたときは20%以下の細胞が凝集物に見い出された。この実験の結果はRothlein, R等により開示された[J. Exper. Med. 163: 1132-1

149(1986)]。

#### 【0046】実施例5

細胞凝集はLFA-1レセプターを必要とするEBV形質転換リンパ芽球細胞を実施例1で記載した方法により患者から調製した。この細胞をLFA-1を認識し得るモノクローナル抗体に対してスクリーニングし、細胞がLFA-1欠損であることを見い出した。実施例2で記載した定量凝集アッセイを上記LFA-1欠損細胞を用いて行った。この細胞はPMAの存在においても自発的に凝集しなかった。

#### 実施例6

##### ICAM-1の発見

実施例5のLFA-1欠損細胞をカルボキシフルオレスセインジアセテートで標識した[Patarroyo, M. 等, *Cell. Immunol.* 63: 237-248(1981)]。標識細胞を同原またはJY細胞と1:10の比で混合し凝集物中のフルオレスセイン標識細胞の割合を“Rothlein, R.等, *J. Exper. Med.* 163: 1132-1149(1986)”の方法に従って測定した。LFA-1欠損細胞はLFA-1発現性細胞と共凝集し得ることを見い出した(第4図)。

【0047】LFA-1が凝集形成またはその維持にのみ重要であるかどうかを決定するために、LFA-1に結合し得る抗体を上記の前以って形成させた凝集に加えた。抗体の添加は上記の前以って形成させた凝集を強く分裂させることが判った。時間経過ビデオ記録計は前以って形成させた凝集へのモノクローナル抗体の添加が2時間以内に分裂を生じ始めることを示した(表1)。LFA-1に対するモノクローナル抗体の添加後、凝集中の個々の細胞の仮足運動および形状変化は変わらないまま続いた。個々の細胞は凝集物の周囲から次第に解離し、8時間までに細胞は殆んど分散した。ビデオ時間経過によれば、LFA-1モノクローナル抗体による前以って形成させた凝集の分裂は時間を逆のぼって行ったLFA-1モノクローナル抗体の不存在下での凝集過程と等価であった。

#### 【0048】

##### 【表1】

表 1

抗LFA-1モノクローナル抗体の前以って形成 させたPMA誘起JY細胞凝集物の分裂能力			
凝 集 点 数			
実験	2 h <sup>a</sup>	18 h	
		-mAb	+mAb
1	4 <sup>+</sup>	4 <sup>+</sup>	1 <sup>+</sup> <sup>b</sup>
2	3 <sup>+</sup>	4 <sup>+</sup>	1 <sup>+</sup> <sup>c</sup>
3	5 <sup>+</sup>	5 <sup>+</sup>	1 <sup>+</sup> <sup>d</sup>

定量マイクロタイタープレート中の凝集を観察的に計数した。アッセイ時間全

体を通じて存在した抗LFA-1においては、凝集は $1^+$ 以下であった。

- a モノクローナル抗体添加2時間直前の凝集量
- b TS1/18+TS1/22
- c TS1/18
- d TS1/22

#### 実施例7

LFA-1依存性凝集における2価イオンの必要性  
細胞毒性T細胞とターゲット間のLFA-1依存性粘着はマグネシウムの存在を必要とする〔Martz, E., *J. Cell Biol.* 84: 584, 598 (1980)〕。PMA誘起JY細胞凝集を2価カチオン依存性について試験した。JY細胞はカルシウムまたはマグネシウムイオンを含まない培地中では凝集しなかった(実施例2のアッセイを用いて)。2価マグネシウムの添加は0.3 mM程の低い濃度で凝集を行った。カルシウムイオン単独の添加は殆んど効果がなかった。しかしながら、カルシウムイオンはマグネシウムイオンのPMA誘起凝集を補佐する能力を増強することが判った。1.25 mMのカルシウムイオンを培地に加えたときは、0.02 mM程の低いマグネシウムイオン濃度で凝集を補佐することが判った。これらのデータは細胞のLFA-1依存性凝集がマグネシウムイオンを必要とすること、およびカルシウムイオンがそれ自体は不十分であるけれどもマグネシウムイオンと共に凝集を増大させることを示している。

#### 【0049】実施例8

抗ICAM-1モノクローナル抗体を発現し得るハイブリドーマ細胞の単離

ICAM-1に結合し得るモノクローナル抗体を“Rothlein, R.等、*J. Immunol.* 137: 1270-1274 (1986)”の方法に従って単離した。該文献は参考として本明細書に引用する。即ち、3匹のBALB/CマウスをLFA-1欠損患者からのEBV形質転換末梢血単核細胞で腹腔内免疫した〔Springer, T.A.等、*J. Exper. Med.* 160: 1901 (1984)〕。1 ml RPMI 1640培地中約 $10^7$ 個の細胞を各免疫に用いた。免疫はひ臓細胞をマウスから取り出す前の45日、29日および4日で行い所望のハイブリドーマ細胞系を産生させた。ひ臓細胞の取り出し前3日に、マウスに追加の0.15 ml培地中 $10^7$ 細胞を投与した(静注)。

【0050】上記の動物からの単離ひ臓細胞をP3×73 Ag8.653ミエローマ細胞と4:1の比率で“Galfré, G.等、*Nature* 266: 550 (1977)”のプロトコルに従って融合させた。得られたハイブリドーマ細胞の各アリコートを96ウェルマイクロタイタープレートに入れた。各ハイブリドーマ上清を凝集についてスクリーニングし、1つの抑制ハイブリドーマ(100以上のウェル試験のうちから)をクローニングし限定希釈によりサブクローニングした。このサブクローンはRP1/1.1.1と表示した(以後“RP1/1”と表示する)。モノクローナル抗体RP1/1はLFA-1発現

性細胞系JYのPMA刺激凝集を一貫して抑制することを見出した。RP1/1モノクローナル抗体はいくつかのLFA-1 $\alpha$ または $\beta$ サブユニットに対するモノクローナル抗体よりも等価かわずかに小さく凝集を抑制した。これに対し、コントロールのHLAに対するモノクローナル抗体(これはJY細胞上に多量に発現する)は凝集を抑制しなかった。モノクローナル抗体RP1/1と結合した抗原は細胞間粘着分子-1(ICAM-1)と定義する。

#### 【0051】実施例9

ICAM-1を特性化するための抗ICAM-1モノクローナル抗体の使用

ICAM-1の性質を限定するために、特にICAM-1がLFA-1と異なるかどうかを決定するために、細胞たん白質をモノクローナル抗体RP1/1を用いて免疫沈降させた。免疫沈降は“Rothlein, R.等の方法に従って行った〔*J. Immunol.* 137: 1270-1274 (1986)〕。JY細胞を新たに1 mMフェニルメチルスルホニルフルオリド、0.2単位/mlのトリプシンヒビターアプロチニンを加えた1%トリトンX-100、0.14 MのNaCl、10 mMのトリス、pH8.0(溶解バッファー)中で $5 \times 10^7$ 細胞/mlで20分間、4℃で溶解させた。溶解物を10,000×gで10分間遠心しCNBr活性化グリシン抑制セファロースC1-4Bの50%懸濁液50 mlで1時間、4℃で前処理した。1 mlの溶解物をセファロースC1-4Bに結合させたモノクローナル抗体(1 mg/ml)の50%懸濁液の20  $\mu$ lで4℃で一晩免疫沈降させた〔Springer, T.A.等、*J. Exper. Med.* 160: 1901 (1984)〕。セファロース結合モノクローナル抗体は“March, S. 等の方法に従って炭酸塩バッファー中のセファロースC1-4BのCNBr活性化法を用いて調製した〔*Anal. Biochem.* 60: 149 (1974)〕。洗浄した免疫沈降物をSDS-PAGEおよび銀染色に“Morrissey, J. H. *Anal. Biochem.* 117: 307 (1981)”の手順に従って供した。

【0052】SDSサンプルバッファー〔HD, M. K. 等、*J. Biol. Chem.* 258: 636 (1983)〕による100℃でのたん白質溶出後、各サンプルを半分に分けて還元(図5A)または非還元(図5B)の各条件下で電気泳動(SDS-8%PAGE)に供した。分子量50 kdおよび25 kdを有するバンドはモノクローナル抗体セファロースからの免疫グロブリンの長鎖および短鎖に相当した(図5A、レーン3)。25~50 kd分子量範囲の可変量の他のバンドも観察したが、ヘアリー白

血病細胞からの沈降中では見られず、この白血病細胞は90kd分子量バンドのみを与えた。LFA-1の177kd $\alpha$ サブユニットおよび95kd $\beta$ サブユニットは還元(図5A、レーン2)および非還元(図5B、レーン2)の両条件下でICAM-1とは異なって浸透した。【0053】PHA-リンパ芽球凝集に対するモノクローナル抗体RP1/1の効果を測定するために、実施例2で記載した定量凝集アッセイを用いた。即ち、T細胞

芽球細胞をPHAで4日間刺激し、十分に洗浄し、次いでIL-2状態調節培地の存在下に6日間培養した。PHAはこの6日間培養で取り込まれ凝集アッセイに寄与しなかった。異なるT細胞芽球調製物による3種のアッセイにおいて、ICAM-1モノクローナル抗体は一貫して凝集を抑制した(表2)。

【0054】

【表2】

表 2

RP1/1モノクローナル抗体<sup>a</sup>によるPMA刺激PHAリンパ芽球凝集の抑制

実験	PMA	MAb	%凝集	%抑制 <sup>b</sup>
1 <sup>c</sup>	-	対照	9	--
	+	"	51	0
	+	HLA-A, B	58	-14 <sup>d</sup>
	+	LFA-1アルファ	31	39
	+	ICAM-1	31	39
2 <sup>e</sup>	-	対照	10	--
	+	"	78	0
	+	LFA-1ベータ	17	78
	+	ICAM-1	50	36
3 <sup>f</sup>	-	-----	7	
	+	対照	70	
	+	HLA-A, B	80	-14
	+	LFA-3	83	-19
	+	LFA-1アルファ	2	97
	+	LFA-1ベータ	3	96
	+	ICAM-1	34	51

<sup>a</sup> 50ng/mlのPHAで刺激したPHA誘起リンパ球の凝集は実施例2に記載したようにして非凝集細胞の数を顕微鏡により計数することによって間接的に定量した。

<sup>b</sup> PMAおよびX63モノクローナル抗体で処理した細胞に対する%抑制

<sup>c</sup> 凝集はモノクローナル抗体およびPMAの刺激的添加後1時間で測定した。

<sup>d</sup> 負の数は凝集の%促進を示す。

<sup>e</sup> 凝集はモノクローナル抗体およびPMAの刺激的添加後1時間で測定した。

【0055】細胞は200XGで1分間でベレット化し、37℃で15分間インキュベートし、ゆるやかに再懸濁し、100rpmで45分間振とうした。

<sup>f</sup> 細胞はPHAで37℃、4時間前処理した。モノクローナル抗体添加後、各チューブを37℃で20分間静置インキュベートし、75rpmで100分間振とうさせた。LFA-1モノクローナル抗体はICAM-1モノクローナル抗体よりも一貫して抑制的であり、一方HLA-A、BおよびLFA-3モノクローナル抗体は効果なしであった。これらの結果は試験したモノクローナル抗体のうち、LFA-1またはICAM-1に結合し得るモノクローナル抗体のみが細胞粘着を抑制し得ること

を示している。

【0056】実施例10

ICAM-1に対するモノクローナル抗体の調製  
免疫

Balb/cマウスをRPM1培地中の $2 \times 10^7$  JY細胞0.5mlで融合前の103日および24日で腹腔内(i.p.)免疫した。融合前4日および3日に、マウスを0.5mlのRPM1培地中のPMA分化U937細胞でi.p.免疫した。

U937細胞の分化

U937細胞(ATCC CRL-1593)を10%のウシ胎児血清、1%グルタミンおよび50mlの2ng/



mlホルボール-12-ミリスレートアセテート(PMA)含有ジエタマイシン(完全培地)を含むRPMI中 $5 \times 10^5$  /mlで滅菌ポリプロピレン容器中でインキュベートすることによって分化した。このインキュベーションの第3日で、1/2 容量の培地を除去し新しいPMH含有完全培地で置き換えた。4日目、細胞を取り出し、清浄して免疫用に調製した。

#### 【0057】融合

免疫マウスからの脾臓細胞をGalfre等に従ってP3×63Ag 8.653ミエローマ細胞と4:1の比で融合させた[Nature 266:550(1977)]。融合後、細胞を96ウェル平底マイクロタイタープレートに $10^5$  脾臓細胞/ウェルで入れた。

#### 抗ICAM-1陽性細胞の選択

1週間後、50μlの上清を凝集用細胞系としてJYおよびSKW-3の両方を用いて実施例2の定量凝集アッセイでスクリーニングした。JY細胞凝集を抑制するがSKW-3凝集は抑制しない上清からの細胞を選択し限定希釈を用いて2回クローニングした。

【0058】この実験により、抗ICAM-1モノクローナル抗体を産生する3種のハイブリドーマ系の同定およびクローニングができた。これらのハイブリドーマ系により産生した抗体は、それぞれ、IgG<sub>2a</sub>、IgG<sub>2b</sub> およびIgMであった。IgG<sub>2a</sub> 抗ICAM-1抗体を産生するハイブリドーマ細胞系は表示R6'5'D6'E9'B2とした。この好ましいハイブリドーマ細胞系により産生した抗体はR6'5'D6'E9'B2と表示した(以下、“R6-5-D6”と称する)。ハイブリドーマ細胞系R6'5'D6'E9'B2はアメリカンタイプカルチャーコレクション(ATCC)に1987年10月30日寄託し、番号ATCC HB9580を得た。

#### 実施例11

##### ICAM-1の発現と規格化

ICAM-1発現を測定するために、ラジオイムノアッセイを行った。このアッセイにおいては、精製RP1/1をイオドゲンを用いて10μCi/μgの特定の活性にヨウ素化した。内皮細胞を96ウェルプレート中で増殖させ各実験で述べたようにして処理した。各プレートを直接氷上ではなく冷室に0.5~1時間置くことによって4℃に冷却した。各単一層を冷完全培地で3回洗浄し次いで4℃で30分間<sup>125</sup>I RP1/1でインキュベートした。<sup>125</sup>I RP1/1の特異活性を未標識RP1/1を用いて調整して本試験において用いる抗原密度範囲に亘って直線状シグナルを得た。非特異結合を1,000倍過剰の未標識RP1/1の存在下で測定し総結合から差

引き特異性結合を得た。

【0059】上述のラジオイムノアッセイを用いて測定したICAM-1発現はヒトヘソ静脈内皮細胞(HUVEC)およびヒト伏状静脈内皮細胞(HSVEC)上でIL-1、TNF、LPSおよびIFNガンマーにより増大する(表3)。伏状静脈内皮細胞は本試験においては成人組織由来の培養大静脈内皮細胞中のヘソ静脈内皮細胞からの結果を確認するために用いた。ICAM-1の基礎的発現はヘソ静脈内皮細胞よりも伏状静脈内皮細胞上で2倍高い。ヘソ静脈内皮細胞の組換えIL-1アルファ、IL-1ベータ、およびTNFへの露出はICAM発現を10~20倍増大させる。IL-1アルファ、TNFおよびLPSは最大効力インデューサーであり、IL-1は重量基準および応答の飽和濃度では効力はそれより小さい。100ng/mlでのIL-1ベータはICAM-1発現をHUVEC上で9倍、HSVEC上で7.3倍増大させ、半-最高増加は15ng/mlで起った。50ng/mlのrTNFはICAM-1発現をHUVEC上で16倍、HSVEC上で11倍増大させ、半-最高効果は0.5ng/mlであった。インターフェロングアンマーはICAM-1発現において10,000U/mlでHUVEC上で5.2倍またはHSVEC上で3.5倍の有意の増大を示した。10μg/mlでのLPSの効果はrTNFの効果と強さにおいて同じようであった。これら媒介物の対の組合せはICAM-1発現において追加の効果または追加の効果よりもわずかに小さい効果をもたらした(表3)。rTNFとrIL-1ベータまたはrIFNガンマーとの交差滴定は次善または最善の濃度での効果において共働作用を示さなかった。

【0060】LPSは培地中でときどき見出される基準で内皮細胞上でのICAM-1発現を増大させたので、基礎的ICAM-1発現がLPSに基づき得る可能性を試験した。いくつかの血清バッチを試験したとき、低エンドトキシン血清が25%までの低ICAM-1基礎発現を与えることを見出した。ここで示した結果はすべて低エンドトキシン血清中で増殖させた内皮細胞のものであった。しかしながら、LPS中和性抗生物質ポリミキシンBの10μg/mlでの添加はICAM-1発現をわずかに追加の25%に減少させた。IL-1またはTNFによる処理時のICAM-1発現の増大は10μg/mlポリミキシンBの存在によつては効果はなかった。上記ポリミキシン濃度はこれらの調製物中で低エンドトキシン濃度として一貫させている。

#### 【0061】

##### 【表3】

表 3

抗ICAM-1モノクローナル抗体

<sup>125</sup>I 特異性結合 (CPM)

HUVEC

HSVEC

603±11

—

1132±31

—

条件 (16hr)

対 照

100 ng/ml rIL-1ベータ	5680±633	9X	8320±766	7.3x
50 ng/ml rIL-1アルファ	9910±538	16X	—	—
50 ng/ml rTNFアルファ	9650±1500	16X	12690±657	11.2x
10 μg/ml LPS	9530±512	16X	10459±388	9.2x
10 ng/ml rIFNガンマー	3120±308	5.2x	4002±664	3.5x
rIL-1ベータ+rTNF	1469±1410	24x	16269±660	14x
rIL-1ベータ+LPS	13986±761	23X	10870±805	10x
rIL-1ベータ+rINFガンマー	7849±601	13X	8401±390	7.4x
rTNF+LPS	15364±1241	24X	16141±1272	14x
rTNF+rIFNガンマー	13480±1189	22X	13238±761	12x
LPS+IFNガンマー	10206±320	17x	10987±668	10x
ポリミキシンB (10 μg/ml)	480±23	—	—	—
ポリミキシンB+rIL-1	5390±97	11X	—	—
ポリミキシンB+rTNF	9785±389	20X	—	—
1 μg /ml LPS	7598±432	13X	—	—
ポリミキシンB+LPS	510±44	1.1X	—	—

HVECおよびHSVEC-HUVECまたはHSVEC上のICAM-1発現の上方規格化 (upregulation) は96ウェルプレートに1:3で融合性単一層から種付し融合状に増殖させた。次いで細胞を各物質または培地で16時間処理しRIAを方法的に行った。すべての数値は4回繰返しで行った。

#### 【0062】実施例12

ICAM-1のインターロイキン1およびガンマインターフェロン誘起の動力学

皮膚繊維芽細胞上でのICAM-1発現へのインターロイキン1およびガンマインターフェロン効果の動力学をDustin, M.L. 等の<sup>125</sup>Iヤギ抗マウスIgG結合アッセイを用いて測定した〔J. Immunol. 137: 245-254 (1986) ; 該文献は参考として本明細書に引用する。〕この結合アッセイを行うために、ヒト皮膚繊維芽球を96ウェルマイクロタイタープレート中で2~8×10<sup>4</sup> 細胞/ウェル (0.32cm<sup>2</sup>) に増殖させた。細胞を実施例1で記載したようにして補充したRPMI 1640培地で2回洗浄した。細胞をさらにハンス平衡塩溶液 (HBSS)、10 mMのHEPES、0.05% NaN<sub>3</sub> および10%の熱不活化ウシ胎児血清で1回洗浄した。この結合用バッファーでの洗浄は4℃で行った。各ウェルに上記の結合用バッファー50 μl およびX63およびW6/32による適当なハイブリドーマ上清50 ml を、それぞれ陰性および陽性コントロールとして加えた。30分間、4℃でのインキュベーション後、ウェルを2回結合用バッファーで洗浄し、第2の抗体<sup>125</sup>I-ヤギ抗マウスIgGを100 μl 中50 nCiで加えた。<sup>125</sup>I-ヤギ抗マウス抗体はイオドゲン (Pierce社)を用いてFraker, P.J. 等の方法に従って調製した〔Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 849 (1978) 〕。4℃で30分間、ウェルを2回200 μlの結合用バッファーで洗浄し、細胞層を100 μlの0.1 N NaOHを加えることによって可溶化した。この

処理および100 μl 洗浄はベックマン5500ガンマカウンター中で計数した。分当り結合の特異的カウントを〔モノクローナル抗体によるcpm〕-〔X63によるcpm〕として計算した。特異的試剤による誘起を含むすべての工程は4回繰返しで行った。

【0063】ICAM-1誘起の半減期2時間のインターロイキン1の効果は半減期3.75時間のガンマインターフェロンの効果よりも急速であった。ICAMの静止レベルに戻る時間は細胞サイクルまたは細胞増殖によっているようであった。静止状態細胞においては、インターロイキン1およびガンマインターフェロン効果は2~3日安定であり、一方対数期培養においては、ICAM-1発現はこれらの誘起剤の除去後2日で基本線に近い。組換えマウスおよびヒトインターロイキン1によるICAM-1誘起および組換えガンマインターフェロンによるICAM-1誘起のドーズレスポンス曲線を図7に示す。ガンマインターフェロンおよびインターロイキン1は1 ng /ml で殆んど同一の効果を有する同じような濃度依存性を有することが判った。ヒトおよびマウス組換えインターロイキン1も同様な曲線を有するが、ICAM-1発現の誘起においてヒトインターロイキン1製剤よりもかなり低い効果を示している。

【0064】シクロヘキサミド (たん白質合成のインヒビター) およびアクチノマイシンD ( mRNA合成のインヒビター) は繊維芽球上でのICAM-1発現におけるインターロイキン1およびガンマインターフェロンの効果を壊滅させる (第4表)。さらにまた、ツニカマイシン (N結合グリコシル化のインヒビター) のみはインターロイキン1効果を43%まで抑制した。これらの結果はたん白質およびmRNA合成がICAM-1発現におけるインターロイキン1およびガンマインターフェロン誘起増大を必要とするがN-結合グリコシル化の方はそれを必要としないことを示している。

#### 【0065】

【表4】

表 4

ヒト皮ふ繊維芽球上のIL1およびガンマーIFNによるICAM-1誘起におけるシクロヘキシミド、アクチノマイシンD、およびツニカマイシンの効果<sup>a</sup>

処 理	<sup>125</sup> I ヤギ抗マウスIgG特異性結合 (cpm)	
	抗ICAM-1	抗HLA-A,B,C
対照 (4 hr)	1524±140	11928±600
+シクロヘキシミド	1513±210	10678±471
+アクチノマイシンD	1590± 46	12276±608
+ツニカマイシン	1461±176	12340±940
IL-1 (10U/ml) (4 hr)	4264±249	12155±510
+シクロヘキシミド	1619±381	12676±446
+アクチノマイシンD	1613± 88	12294±123
+ツニカマイシン	3084±113	13434±661
IFN-γ (10U/ml) (18 hr)	4659±109	23675±500
+シクロヘキシミド	1461± 59	10675±800
+アクチノマイシンD	1326±186	12089±550

<sup>a</sup> ヒト繊維芽球を $8 \times 10^4$  細胞/0.32cm<sup>2</sup> ウェルの密度に増殖させた。

【0066】処理は各試剤を含有する50μl 最終濃度で行った。シクロヘキシミド、アクチノマイシンDおよびツニカマイシンは、それぞれ、サイトカインと同じ時間で20μg/ml、10mMおよび2μg/mlで加えた。すべての数値は4回重複ウェルの平均±SDである。

#### 実施例13

##### ICAM-1の組織分布

組織化学試験をヒト器官の凍結組織上で行い胸腺、リンパ節、腸、皮ふ、じん臓および肝臓中のICAM-1の分布を測定した。そのような分析を行うために、正常ヒト組織の凍結組織切片(4μm厚さ)をアセトン中で10分間固定しモノクローナル抗体、RR1/1でCerf-Bensussan, N. 等により開示されたアビジン-ビオチンコンプレックス法(Vector Laboratories 社、バーリングゲーム、CA)を用いたイムノパーオキシダーゼ法により染色した(J. Immunol. 130:2615(1983))。抗体とのインキュベーション後、切片をビオチン化ウマ抗マウスIgGおよびアビジン-ビオチン化パーオキシダーゼ複合体で順次インキュベートした。各切片は最終的には3-アミノ-9-エチル-カルバゾール(アルドリッチケミカル社、ミルウォーキー、WI)を含有する溶液に浸して呈色反応を行った。次いで、各切片を4%ホルムアルデヒド中で5分間固定させてヘマトキシリンで対向染色(counterstain)させた。コントロール(対照)はRR1/1抗体の代りに無関係のモノクローナル抗体でインキュベートした切片を含んでいた。

【0067】ICAM-1は主要組織親和性コンプレックス(MHC)クラスII抗原の分布を殆んど同じ分布を有していることが判った。すべての組織中の血管(大

および小共に)の殆んどはICAM-1抗体による内皮細胞染色を示した。管内皮染色はじん臓、肝臓および正常皮ふ中の血管に較べてリンパ節、へん臓腺およびパイヤー班中の小胞間(パラコーチカル)領域でより強い。肝臓においては、染色は殆ど洞様毛細血管ライニング細胞に限定され、門静脈および動脈の殆んどをライニングしているヘパトサイトおよび内皮細胞は染色されなかった。胸腺髄質においては、大細胞の拡散染色および樹木染色模様が見られた。皮質においては、染色像は巣状であり主として樹木状であった。胸腺細胞は染色されなかった。末梢リンパ球組織においては、2次リンパ節の胚中心細胞は強く染色していた。あるリンパ節においては、染色像は殆んど樹木状であり、リンパ球の認識し得る染色はなかった。

【0068】マントル領域の細胞のかすかな染色も観察された。さらに、細胞質拡大(指間小網細胞)を有する樹木状細胞および小胞内またはパラコーチカル領域のリンパ球の少数はICAM-1結合性モノクローナル抗体で染色していた。細胞様マクロファージはリンパ節および小腸の薄膜プロブリア内で染色されていた。試験した器官の殆んどのスローマ内に拡散している繊維芽球様細胞(スピンドル形細胞)はICAM-1結合性抗体により染色していた。外皮中のランゲルハンス/不定細胞中では染色は認められなかった。平滑筋組織中でも染色は観察されなかった。外皮細胞の染色はへん臓腺の粘膜中で一貫して見られた。肝細胞、肝管外皮、腸外皮細胞、およびじん臓中の管状外皮細胞は殆どの状況において染色されなかったが、じん臓がん腫を有するじん臓摘出片からの正常じん臓組織の切片はICAM-1の多くの隣接管状細胞の染色を示した。これらの管状外皮細胞

はまた抗HLA-DR結合性抗体によっても染色していた。

【0069】要するに、ICAM-1は管状外皮細胞のような非造血細胞、および組織マクロファージおよびマイトジェン刺激Tリンパ芽球のような造血細胞上に発現する。ICAM-1は末梢血リンパ球に少量発現することが判った。

#### 実施例14

モノクローナル抗体アフィニティークロマトグラフィーによるICAM-1の精製

##### 一般的精製手順

ICAM-1をヒト細胞または組織からモノクローナル抗体アフィニティークロマトグラフィーを用いて精製した。ICAM-1と反応性のモノクローナル抗体RR1/1を最初に精製して不活性カラムマトリックスに結合させた。この抗体は“Rothlein, R.等、*J. Immunol.* 137:1270-1274 (1986)”および“Dustin, M. L. 等、*J. Immunol.* 137:245 (1986)”に記載されている。ICAM-1を細胞膜から細胞を非イオン性洗浄剤トリトンX-100中で近中性pHで溶解することによって可溶化した。可溶性ICAM-1を含有する細胞溶解物をカラムマトリックス材料に非特異的に結合する物質を除去するように設計されたプレカラムに通し、次いでモノクローナル抗体カラムマトリックスに通してICAM-1を抗体に結合させた。抗体カラムをpHをpH11.0まで上昇させた一連の洗浄剤洗浄バッファーで洗浄した。これらの洗浄中、ICAM-1は抗体マトリックスに結合したままであり、結合していないまた弱く結合している不純物は除去された。次いで、結合ICAM-1をpH12.5の洗浄剤バッファーを適用することによってカラムから特異的に溶出させた。

##### 【0070】モノクローナル抗体RR1/1の精製およびセファロースCL-4Bへの共有結合

抗ICAM-1モノクローナル抗体RR1/1はハイブリドーマ含有マウスの腹水またはハイブリドーマ培養上清から標準の硫酸アンモニウム沈降法およびプロテインAアフィニティークロマトグラフィーにより精製した〔Ey 等、*Immunochem.* 15:429 (1978)〕。精製IgGまたはラットIgG (シグマケミカル社、セントルイス、MO) をセファロースCL-4B (ファルマシア社、スウェーデン) に March 等の方法〔*Anal. Biochem.* 60:149 (1974)〕の修正法を用いて共有結合させた。要するに、セファロースCL-4Bを蒸留水中で洗浄し、5Mの $K_2HPO_4$  (pH約12) 中の40mg/ml CNBrで5分間活性化し、次いで0.1 mM HCl で4℃にて長く洗浄した。過剰活性化したセファロースを等量の精製抗体 (0.1 M  $NaHCO_3$ 、0.1 M NaCl 中2~10mg/ml) で再懸濁させた。懸濁液を4℃で18時間ゆるやかな端から端までの回転により

インキュベートした。次いで、上清を未結合抗体について280nmの吸収によりモニターし、活性化セファロースの残りの反応部位をグリシンを0.05Mに加えることによって飽和させた。結合効率は通常90%以上である。

【0071】ヒト臓器から調製した膜の洗浄剤可溶化  
すべての手順を4℃で行った。毛状細胞白血病の患者からの凍結ヒト臓器 (200gラフグメント) を氷上で1 mMのフェニルメチルスルホニルフルオリド (PMSF)、0.2 U/mlのアプロチニンおよび5 mMのイオドアセタミドを含有する200ml トリス-塩水 (50 mMのTris、0.14 MのNaCl、4℃でpH7.4) 中に溶解させた。組織を小片に切断し4℃でテクマー強力ホモジナイザーで均質化した。容量をトリス-塩水で300mlとし、トリス-塩水中10%トウィーン40 (ポリオキシエチレンソルビタンモノパルミテート) 100mlを加え最終濃度2.5%トウィーン40を得た。膜を調製するため、均質化物を3ストロークのドンズ (Dounce) またはより好ましくはテフロンボッターエルブジャムホモジナイザーを用いて抽出し、次いで1000xgで15分間遠心した。上清を残し、ペレットをトリス-塩水中の2.5%トウィーン40の250mlで再抽出した。1000xgで15分間の遠心後、両抽出物からの上清を一緒にし150,000xgで1時間遠心して膜をペレット化した。膜を200mlのトリス-塩水中に再懸濁させることによって洗浄し、150,000xgで1時間遠心した。膜ペレットを200mlのトリス-塩水中に再懸濁させ、モーター駆動ホモジナイザーおよびテフロンベストルで懸濁液が濃密になるまで均質化した。容量を次いでトリス-塩水で900mlまでにし、N-ラウロイルサルコシンを最終濃度1%になるよう加えた。4℃で30分の攪拌後、洗浄剤溶解物中の不溶性物質を150,000xg、1時間での遠心により除去した。トリトンX-100を上清に最終濃度2%に加え、溶解物を4℃で1時間攪拌した。

【0072】JYB-リンパ芽球細胞の洗浄剤可溶化  
EBV形質転換B-リンパ芽球細胞系JYを10%ウシ胎児血清 (FCS) および100 mM HEPESを含有するRPMI 1640中で $0.8 \sim 1.0 \times 10^6$  細胞/mlの密度に増殖させた。ICAM-1の細胞表面発現を増大させるため、ホルボール12-ミリステート13-アセテート (PMA) を細胞を収穫する前に25 ng/mlで8~12時間に加えた。バナジン酸ナトリウム (50  $\mu$ M) もこの時間中に培養物に加えた。細胞を500xgで10分間遠心することによってペレット化しハンス平衡塩溶液 (HBSS) 中で再懸濁および遠心することによって2回洗浄した。細胞 (5リットルの培養物当たり約5g) を50mlの溶解バッファー (0.14 M NaCl、50 mM Tris、pH8.0、1%トリトンX-100、0.2  $\mu$ /ml アプロチニン、1 mMのPMS

F、50  $\mu$ M バナジン酸ナトリウム) 中に4℃で30分間攪拌することによって溶解させた。未溶解核および不溶性片を10,000  $\times$ g で15分間の遠心、次いで150,000  $\times$ g での1時間の上清の遠心および上清のフットマン3mm フィルター紙により濾過により除去した。

#### 【0073】構造検討のためのアフィニティークロマトグラフィー

構造検討に使用する ICAM-1 の大規模精製として、10ml の RR1/1-セファロース CL-4B のカラム (2.5mg の抗体/ゲルの ml で結合)、および CNBr-活性化、グリシン安定化セファロース CL-4B およびラット IgG 結合セファロース CL-4B (2mg/ml) の2種のプレカラムを用いた。各カラムに直列につなぎ、10カラム容量の溶解バッファー、10カラム容量の pH12.5 バッファー (50 mM トリエチルアミン、0.1% トリトン X-100、4℃で pH12.5) で予備洗浄し次いで10カラム容量の溶解バッファーで平衡させた。1リットルのヒトヒ臓の洗浄剤溶解物を0.5~1.0ml/分の流速で負荷させた。2つのプレカラムは RR1/1-セファロースカラムに通す前に溶解物から非特異結合物質を除去するのに用いた。

【0074】負荷後、RR1/1-セファロースのカラムおよび結合 ICAM-1 を (1) 溶解バッファー、(2) 20 mM Tris pH8.0/0.14 M NaCl/0.1% トリトン X-100、(3) 20 mM グリシン pH10.0/0.1% トリトン X-100、および50 mM トリエチルアミン pH11.0/0.1% トリトン X-100 の各々最低5カラム容量で1ml/分の流速で順次洗浄した。すべての洗浄バッファーは1 mM の PMSF と0.2  $\mu$ /ml の アフロチニンを含んでいた。洗浄後、残留結合 ICAM-1 を5カラム容量の溶出バッファー (50 mM トリエチルアミン/0.1% トリトン X-100/4℃で pH12.5) により1ml/3分の流速で溶出させた。溶出 ICAM-1 を1ml フラクシオンに集め直ちに0.1ml の1M トリス、pH6.7を加えて中和させた。ICAM-1 を含有するフラクシオンを10  $\mu$ l のアリコート用の SDS-ポリアクリルアミド電気泳動 [Spranger 等、J. Exp. Med. 160: 1901 (1984)] により次いで銀染色 [Morrissey, J. H., Anal. Biochem. 117: 307 (1981)] によって同定した。これらの条件下で、ICAM-1 のバルクが約1カラム容量に溶出し、銀染色電気泳動から判断して90%以上の純度であった (アフィニティマトリックスから漏出した少量の IgG は主要不純物であった)。ICAM-1 を含有するフラクシオンをプールしセントリコン-30 マイクロコンセントレーター (アミコン社、デンバース、MA) を用いて約20倍に濃縮した。精製 ICAM-1 をプールのエタノール沈降アリコートの Lowry たん白質アッセイにより定量した。約500  $\mu$ g の純 ICAM-1 を200g のヒトヒ臓から調製できた。

【0075】約200  $\mu$ g の精製 ICAM-1 を分離用 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により第2段階の精製に供した。ICAM-1 を示すバンドはゲルを1 M KCl 中にソーキングすることによって可視化させた。ICAM-1 を含むゲル領域を検査して "Hunkapiller 等、Meth. Enzymol. 91: 227-236 (1983)" の方法によって電気溶出させた。精製たん白質は SDS-PAGE および銀染色で判断したとき98%以上の純度であった。

#### 官能試験のための ICAM-1 のアフィニティ精製

官能性試験用の ICAM-1 を前述したような JY 細胞からの洗浄剤溶解物から精製したが、小スケール (1ml の RR1/1-セファロースカラム) で次の修正を加えて行った。すべての溶液は50  $\mu$ M バナジン酸ナトリウムを含んでいた。カラムを0.1% トリトン X-100 含有 pH11.0 バッファーで洗浄後、カラムを0.1% トリトン X-100 に代えて1% の n-オクチルベーター-D-グルコピラノサイド (オクチルグルコシド) 含有の同じバッファー5カラム容量で再洗浄した。オクチルグルコシドは ICAM-1 に結合したトリトン X-100 を除去し、トリトン X-100 と異なりその後透析により除去できる。次いで、ICAM-1 を0.1% トリトン X-100 の代わりに1% のオクチルグルコシドを含む pH12.5 バッファーで溶出させ、分析し、上述のようにして濃縮した。

#### 【0076】実施例15

##### 精製 ICAM-1 の特性化

ヒトヒ臓から精製した ICAM-1 は SDS-ポリアクリルアミドゲル中で Mr 72,000~91,000 の広いバンドとして浸透する。JY 細胞から精製した ICAM-1 も Mr 76,500~97,000 の広いバンドとして浸透する。これら Mr は種々の細胞源から免疫沈降させた ICAM-1 の報告された範囲にある: JY 細胞の Mr=90,000、骨髄単球細胞系 U937 上の 114,000、および繊維芽球上の 97,000 [Dustin 等、J. Immunol. 137: 245 (1986)]。Mr のこの広い範囲は広汎であるが変化し得る度合のグリコシル化に貢献する。非グリコシル化プレカーサーは Mr 55,000 を有する (Dustin 等)。JY 細胞またはヒトヒ臓から精製したたん白質は、その元のアフィニティカラムへの再結合能力によりまた RR1/1-セファロースによる免疫沈降および SDS-ポリアクリルアミド電気泳動により明らかなように、その抗原活性を保持している。

【0077】ICAM-1 のペプチドフラグメントを調製するためには、約200  $\mu$ g を2mM ジチオスレイトール/2% SDS で還元し、次いで5 mM の沃化酢酸でアルキル化した。たん白質をエタノールで沈降させ、0.1 M  $\text{NH}_4\text{CO}_3$ /0.1 mM  $\text{CaCl}_2$ /0.1% 双性イオン剤 (2wittergent) 3-14 (カルビオケミ社) 中に再溶解させ、1% w/w トリアシンで37℃、4時間消化

し、次いで1%トリプシンで37℃、12時間の追加の消化を行った。トリプシンペプチドを逆相HPLCにより0.4×15cm C4カラム (Vydac 社) を用いて精製した。ペプチドは0.1%トリフルオロ酢酸中で0%~60%アセトニトリルの直線勾配によって溶出した。選択

したペプチドをガス相マイクロシーケンセーター (アプライドバイオシステムズ社) での配列分析に供した。この試験から得られた配列情報を第5表に示す。

【0078】

【表5】

表 5

ICAM-1トリプシンペプチドのアミノ酸配列

アミノ酸残基	50a	50b	46a	46b	X	45	K	AA	J	U	O	M1
1	[T/V]	A	(V/A)	E	V	S	L	E	A	L	V	L
2	F	S	Q	P	E	F	N	L	G	L	T	L/E
3	L	I	T	A	L	P	P	D	S	G	L	P/(G)
4	T	S	F		A	A	T	L	V	I		P
5	V	L	P		P	P	V	R	L	E		G/Y
6	Y	G	L		L	N	T	P	V	T		N/L
7	P	W	P		P	V	Y	Q	T	P		(N)
8	T	P	I		I	T/I	G	G	C	P/V		(Q)
9	S	F	G		(G)	L	-	L	S	K		(E)
10	E		E		(Q)	-	D	E	T			(D)
11	A		S		D/P	K	S	L	S			
12	G/S		V		V	P	F	F	C			
13	A		T		D	Q	S	E	D			
14	G		V		W	V/L	A	-	Q			
15						I	K	T	P			
16								S	K			
17								A				
18								P				
19								X				
20								Q				
21								L				

( ) =低信頼配列

[ ] =極めて低信頼配列

/ =配列中の不明確さを示す、最も可能性あるアミノ酸を最初に挙げている。

【0079】a =主要ペプチド

b =非重要ペプチド

実施例16

ICAM-1遺伝子のクローニング

ICAM-1の遺伝子は任意の種々の手順を用いてクローニングできる。例えば、ICAM-1のトリプシンフラグメントのシーケンシング (第5表) から得られたアミノ酸配列情報を用いてICAM-1遺伝子に相当するオリゴヌクレオチド配列を同定し得る。また、ICAM-1遺伝子は抗ICAM-1抗体を用いてICAM-1を産生するクローンを検出することによってもクローニングできる。

【0080】オリゴヌクレオチドプローブを用いることによるICAM-1遺伝子のクローニング

遺伝子コード [Watson, J.D., *Molecular Biology of t*

he Gene, 第3版, W.A.ベンジャミン社、メロノパーク、CA (1977)] を用いて、1種以上の異なるオリゴヌクレオチドを同定でき、その各々はICAM-1トリプシンペプチドをコードし得るものである。特定のオリゴヌクレオチドが実際に現実のICAM-1コード配列を構成する可能性は異常な塩基対関係および特定のコドンを実際に真核細胞に用いて (特定のアミノ酸をコードする) 頻度を考慮することによって評価できる。そのような“コドン利用法則”は“Lathe, R. 等, J. Melec. Biol. 183: 1~12 (1985)”により開示されている。Latheの“コドン利用法則”を用いて、理論的に“最も可能性のある”ICAM-1トリプシンペプチド配列をコードし得るヌクレオチド配列 (即ち、最低の不要物を有するヌクレオチド配列) を含有する単一オリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドのセットを同

定する。

【0081】ICAM-1フラグメントをコードし得る理論的に“最も可能性のある”配列を含むオリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドのセットを用いて“最も可能性ある”配列または配列のセットにハイブリッド化し得る相補オリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドのセットの配列を同定する。そのような相補配列を含むオリゴヌクレオチドはICAM-1遺伝子を同定し単離するプローブとして使用できる〔Maniatis, T.等、Molecular Cloning A Laboratory Manual, コールドスプリング ハーバー プレス社、コールドスプリング、NY (1982)〕。上記のセクションCに記載されているように、ICAM-1遺伝子を含有する可能性ある真核DNA調製物からICAM-1遺伝子をクローニングすることは可能である。ICAM-1たん白質をコードする遺伝子を同定しクローニングするためには、DNAライブラリーをその上記のオリゴヌクレオチドプローブとハイブリッド化する能力についてスクリーニングする。正常な二倍体細胞中にはICAM-1の遺伝子のほんの2つのコピーしか存在しないようであるので、またICAM-1遺伝子はクローニングが望まれない大きな非転写介在配列(イントロン)を有し得る可能性がある。好ましいのはゲノムDNAよりはむしろICAM-1産生細胞のmRNAから調製したcDNAライブラリーからICAM-1コード配列を単離することである。適当なDNAまたはcDNA調製物は酵素的に開裂させ、ランダムにせん断し、連結反応させて組換えベクターとする。これら組換えベクターの上述のオリゴヌクレオチドプローブとハイブリッド化する能力を測定する。ハイブリッド化の手順は、例えば、“Maniatis, T., Molecular Cloning A Laboratory Manual, コールドスプリング ハーバー プレス社、コールドスプリング ハーバー、NY (1982)”または“Haymes, B.T.等、Nucleic Acid Hybridization a Practical Approach, IRLプレス社、オックスフォード、英国 (1985)”において開示されている。そのようなハイブリッド化ができることが判っているベクターを分析してベクターが含有するICAM-1配列の程度および性質を分析する。純粋に仮説的な考察によれば、ICAM-1分子をコードするような遺伝子はほんの18ケのヌクレオチドを有するオリゴヌクレオチドを用いて明確に同

定できるであろう(ハイブリッド化スクリーニングにより)。

【0082】即ち、要約すれば、ICAM-1ペプチド配列の現実の同定により、そのようなペプチドをコードし得る理論的に“最も可能性ある”DNA配列またはそのような配列のセットの同定ができる。この理論的配列に相補性のオリゴヌクレオチドを構築することにより(あるいは“最も可能性ある”オリゴヌクレオチドのセットに相補的なオリゴヌクレオチドのセットを構築することにより)、ICAM-1遺伝子を同定し単離するプローブとして機能し得るDNA分子(またはDNA分子のセット)が得られる。第5表のICAM-1ペプチド配列を用いて、AAおよびJペプチドをコードし得るオリゴヌクレオチドの“最も可能性ある”配列の配列を決定した(それぞれ、第6表および第7表)。これら配列に相補性のオリゴヌクレオチドを合成し精製してICAM-1遺伝子配列を単離するプローブとした。適当なサイズ選定cDNAライブラリーをPMA誘起HL-60細胞からおよびps刺激ヘソ帯静脈内皮細胞からのポリ(A)<sup>+</sup>RNAから調製した。サイズ選定cDNAライブラリーは“Gubler, U.等〔Gene 25:263-269 (1983)〕およびCorbi, A.等、〔ENBO J. 6:4023-4028 (1987)〕の方法に従ってPMA誘起HL-60細胞からのポリ(A)<sup>+</sup>RNAを用いて調製した。これらの文献は参考として本明細書に引用する。

【0083】サイズ選定cDNAライブラリーはps 5 μg/mlで4時間刺激したヘソ帯静脈上皮細胞からのポリ(A)<sup>+</sup>を用いて調製した。RNAは上記細胞を4Mグアニジウムイソシアネート中で均質化し上清をCsCl勾配により超遠心に供することによって抽出した〔Chirgwin, J. M.等、Biochem. 18:5294-5299 (1979)〕。ポリ(A)<sup>+</sup>RNAは全RNAスベイスの混合物からオリゴ(dT)-セルロースクロマトグラフィー(タイプ3、コラボラティブ リサーチ社)を用いて単離した〔Aviv, H.等、Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 69:1408-1412 (1972)〕。

【0084】

【表6】

表 6  
ICAM-1 AAペプチドをコードし得る最も可能性ある  
ヌクレオチド配列に相補性のオリゴヌクレオチド

ICAM-1の アミノ酸残基	ICAM-1 AAペプチド	AAペプチドをコード する最も可能性ある配列	相補配列
162	Glu	5' G	3' C



		A	T
		G	C
163	Leu	C	G
		T	A
		G	C
164	Asp	G	C
		A	T
		C	G
165	Leu	C	G
		T	A
		G	C
166	Arg	C	G
		G	C
		G	C
167	Pro	C	G
		C	G
		C	G
168	Gln	C	G
		A	T
		G	C
169	Gly	G	C
		G	C
		C	G
170	Leu	C	G
		T	A
		G	C
171	Glu	G	C
		A	T
		G	C
172	Leu	C	G
		T	A
		G	C
173	Phe	T	A
		T	A
		T	A
174	Glu	G	C
		A	T
		G	C
		3'	5'
		A	T
175	Asn	A	T
		C	G
		A	T
176	Thr	C	G
		C	G
		U	A
177	Ser	C	G
		A	
		3'	5'

---

【0085】

【表7】

表 7

ICAM-1 Jペプチドをコードし得る最も可能性ある  
ヌクレオチド配列に相補性のオリゴヌクレオチド

ICAM-1の アミノ酸残基	ICAM-1 AAペプチド	AAペプチドをコード する最も可能性ある配列	相補配列
		5'	3'
19	Val	G	C
		T	A
		G	C
20	Thr	A	T
		C	G
		C	G
21	Cys	T	A
		G	C
		C	G
22	Ser	T	A
		C	G
		C	G
23	Thr	A	T
		C	G
		C	G
24	Ser	T	A
		C	G
		C	G
25	Cys	T	A
		G	C
		T	A
26	Asp	G	C
		A	T
		C	G
27	Gln	C	G
		A	T
		G	C
28	Pro	C	G
		C	G
		C	G
29	Lys	A	T
		A	T
		3'	5'

第1のストランドcDNAをポリ(A)+RNA、トリ  
骨ずい芽球症ウィルス逆転写酵素(ライフサイエンス  
社)およびオリゴ(dT)プライマーと用いて合成し  
た。DNA-RNAハイブリッドはラナーゼH(BRL  
社)で消化、第2ストランドはDNAポリメラーゼI  
(ニューイングランド バイオラプス社)を用いて合成  
した。生成物をEcoR1メチラーゼ(ニューイングラン

ド バイオラプス社)でメチル化し、EcoR1リンカー  
(ニューイングランド バイオラプス社)にプラントエ  
ンド連結反応させ、EcoR1で消化し低融点アガロース  
ゲル上でサイズ選定した。500bpより大きいcDN  
Aを前以てEcoR1消化させ脱リン酸化させているλg  
t10に連結反応させた(ストラタジーン)。連結反応  
生成物を次いでパッケージングした(ストラタジーン)

ールド)。

【0086】次に、ヘソ帯静脈内皮細胞およびHL-60 cDNAライブラリーを20,000 PF $\mu$ /150mmプレートで塗布した。組換えDNAを複製中でニトロセルロースフィルターに移し、0.5 M NaOH /1.5 M NaCl 中で変性し1 M トリス、PH7.5/1.5 M NaCl 中で中和し、80℃で2時間ベーキングした(Benton, W.D.等、Science 196:180-182 (1977))。フィルターをプレハイブリッド化し、5 $\times$  Denhardt 溶液、50 mM NaPO<sub>4</sub> および1  $\mu$ g/ml のサケ精子DNAを含む5 $\times$ SSC中でハイブリッド化した。プレハイブリッド化は45℃で1時間行った。ハイブリッド化は32 bp ( '5-TTGGGCTGGTCACAGGAGGTGGAGCAGGTGAC) または47 bp ( '5-GAGGTGTTCTCAAACAGCTCCAGGCCCTGGGGCCGCAGGTCCAGCTC) 抗感覚オリゴヌクレオチドを上述の方法で、それぞれICAM-1トリプシンペプチドJおよびAA(第6表および第7表)上で用いて行った[Lathe, R. J. Melec. Bio l. 183:1-12 (1985)]。オリゴヌクレオチドは $\gamma$ -(<sup>32</sup>P) ATPでT<sup>4</sup> ポリヌクレオチドキナーゼおよび製造者(ニューイングランド バイオラプス社)に推奨される条件を用いて末端標識した。オーバーナイトハイブリッド化に続いて、フィルターを2 $\times$ SSC/0.1% SDSで30分間、45℃で2回洗浄した。ファージをハイブリッド化を示すアラゲから単離し、連続再塗布および再スクリーニングにより精製した。

#### 【0087】抗ICAM-1抗体の使用によるICAM-1の遺伝子のクローニング

ICAM-1の遺伝子を別法として抗ICAM-1抗体の使用によりクローニングできる。DNAまたはより好ましくはcDNAをICAM-1を発現し得る細胞から抽出し精製する。精製cDNAをフラグメント化し(せん断化、エンドヌクレアーゼ消化等により)DNAまたはcDNAフラグメントのプールを調製する。このプールからのDNAまたはcDNAフラグメントを発現ベクターにクローニングして各々のメンバーが特異的クローニングDNAまたはcDNAフラグメントを含有する発現

ベクターの遺伝子ライブラリーを調製する。

#### 実施例17

##### cDNAクローンの分析

陽性クローンからのファージDNAをEcoR1で消化し、1つのクローンからのcDNAをプローブとして用いてサウサー分析により試験した。交差ハイブリッド化した最大サイズcDNA挿入物をプラスミドベクターpGEM4Z(プロメガ社)のEcoR1サイトにサブクローニングした。両配向にcDNAを含むHL-60サブクローンをエンドヌクレアーゼIII消化(Henikoff, S., Gene 28:351-359 (1984))により製造者の推奨(エラスーアーベース、プロメガ社)に従って欠落させた。漸次的に欠落させたcDNAを次いでクローニングしてジデオキシヌクレオチド鎖終端シーケンシングに製造者の推奨(シーケナーゼ、U. S. バイオケミカル社)に従って供した(Sanger, F.等、Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 74:5463-5467 (1977))。HL-60 cDNA 5' およびコード用領域を両ストランド上で完全にシーケンシングし、3' 領域を両ストランド上で約70%シーケンシングした。代表的な内皮cDNAをその長さの殆どに亘って4 bp 認識制限酵素フラグメントのショットガンクローニングによりシーケンシングした。

【0088】1種のHL-60および1種の内皮細胞cDNAのcDNA配列を確立した(図8~図10)。3023 bp 配列は短い5' 未翻訳領域と位置2966に共通ポリアデヒル化シグナルを有する1.3 kb 3' 未翻訳領域を含む。最長開放読み枠は位置58の第1ATGで始まり位置1653のTGA終端トリプレットで終る。ほん訳アミノ酸配列と合計91個のアミノ酸の8個の異なるトリプシンペプチドから決定した配列(図8~図10中でアンダーラインを施している)との間の同一性は信頼できるICAM-1 cDNAが単離されたことを確認した。配列分析に基づき、LFA-1により認識されたICAM-1内の可能性あるペプチドを第8表に示す。

【0089】

【表8】

表 8  
ICAM-1トリプシンペプチドのアミノ酸配列

ペプチド	残基	配 列
J	14-29	XGSVLVTCSTSCDQPK
U	30-39	LLGIETPL(P)(K)
50	78-85	(T)FLTVYXT
X	89-95	VELAPLP
AA	161-182	XELDLRPQGLE-- LFEXTSAPXQL
K	232-246	LNPTVTYGXDSFSAK

— 配列が次の行に続くことを示す。アンダーラインを施した配列はオリゴヌクレオチドプローブを調製するのに用いた。

疎水性分析 (Kyte, J.等, *J. Melec. Biol.* 157: 105-132 (1982)) は27残基シグナル配列の存在を示唆している。+1グルタミンの役目は3種のICAM-1たん白質調製物上にN-末端配列を本発明で得ることができないことと一致しており; グルタミンはフィログルタミン酸に環状化しブロックしたN-末端をもたらす。1~453のほん訳配列は主として親水性であり24残基の疎水性の推定トランスメンブランドメインが続く。トランスメンブランドメインはその後すぐに27残基の推定細胞質ドメイン内に含まれた数個の荷電残基が続く。

【0090】成熟ポリペプチド鎖の予示サイズは55,219ダルトンであり、脱グリコシル化ICAM-1の観察されたサイズ55,000と良好に一致している [Dustin, M.L.等, *J. Immunol.* 137: 245-254 (1986)]。8個のN-結合グリコシル化部位が予示される。これらの部位の2のトリプシンペプチド配列中のアスパラギンの不存在はそれらのグリコシル化とそれらの細胞外配向を確認している。高マンノースN-結合カルボハイドレート当り2,500ダルトンを想定すると、75,000ダルトンのサイズがICAM-1プレカーサーについて予示され、観察されたサイズ73,000ダルトン [Dustin, M.L.等, *J. Immunol.* 137: 245-254 (1986)] に匹敵する。高マンノースのコンプレックスカルボハイドレートへの転換後、成熟ICAM-1糖たん白質は細胞の種類により76~114kdである [Dustin, M.L.等, *J. Immunol.* 137: 245-254 (1986)]。即ち、ICAM-1は高度にグリコシル化されているのが典型的な完全膜たん白質である。

#### 【0091】実施例18

ICAM-1は免疫グロブリン超遺伝子群のインテグリン結合性1員であるICAM-1内部繰返し配列をマイクロジェニ (Microgenie) たん白質配列プログラム [Queen, C.等, *Nucl. Acids Res.* 12: 581-599 (1984)] を用い次いで検査することによって行った。ICAM-1のIgM、N-CAMおよびMAGへの配列をマイクロジェニおよびALIGNプログラム [Dayhoff, M.O.等, *Meth. Enzymol.* 91: 524-545 (1983)] を用いて行った。ナショナル バイオメデカル リサーチ ファンデーション (National Biomedical Research Foundation) に保管されている4種のたん白質配列データベースをWilliams と PearsonのFASTPプログラムを用いてたん白質配列の類似性について調査した [Lipman, D. J.等, *Science* 227: 1435-1439 (1985)]。

【0092】ICAM-1はインテグリンのリガンドであるので、免疫グロブリン超遺伝子群の1員であることは予期されなかった。しかしながら、ICAM-1配列の調査はその配列が免疫グロブリン超遺伝子群中の身内関係に提唱されたすべての規準を満たすことを示している。これらの基準を以下に説明する。ICAM-1の全細胞外ドメインを図11(A)に配列して示した5つの相同性免疫グロブリン様ドメインから構築する。ドメイン1-4はそれぞれ88、97、99および99の残基長であり、かくして典型的なIgドメインサイズを有しており; ドメイン5は68個の残基中で切り取られている。FASTPプログラムを用いてのNBRFデータベースの調査はIgMとIgG Cドメインを包含する免疫グロブリン超遺伝子群の1員、T細胞レセプター $\alpha$ サブユニット可変ドメイン、およびアルファ1ベータ糖たん白質と有意の相同性を示していた (図11(B)-(D))。

【0093】上記の情報を用いて、ICAM-1のアミノ酸配列を免疫グロブリン超遺伝子群の他の1員のアミノ酸配列と比較した。Ig超遺伝子群ドメインの3つのタイプ、V、C1およびC2は分化されている。VとCの両ドメインは内部ドメインスルフィド結合により一緒に結合している2 $\beta$ -シートから構築されており; Vドメインは9つの抗平行 $\beta$ -ストランドを有しCドメインは7つ有している。一定のドメインを図11(A)に示した特徴的残基に基づいてC<sub>1</sub>およびC<sub>2</sub>-セットに分割した。C<sub>1</sub>-セットは抗原認識中に含まれるたん白質を含んでいる。C<sub>2</sub>-セットは数個のF<sub>c</sub>レセプターとCD2, LFA-3, MAGおよびNCAMを包含する細胞粘着中に含まれるたん白質を含んでいる。ICAM-1ドメインはこのセット中でICAM-1と置き替わっているC<sub>2</sub>-セットのドメインと最も強い相同性を有することが判った; このことは図11の $\beta$ -ストランドB-Fについて示されているようにC<sub>1</sub>ドメインよりもC<sub>2</sub>中の保持残基により強く類似している点にも反映されている。また、ICAM-1ドメインはVおよびC<sub>1</sub>ドメイン中の上記ストランドとよりもC<sub>2</sub>ドメインの $\beta$ ストランドAおよびGとより一層良好に列んでおり、全C<sub>2</sub>ドメイン強度を横切って良好な配列を可能としている。MCAM, MAGおよびアルファ1- $\beta$ 糖たん白質からのC<sub>2</sub>ドメインとの配列は図11(B)および図11(C)に示されており; 同一性は28~33%の範囲であった。T細胞レセプターV $\alpha$ 27%同一性およびIgM Cドメイン334%同一性ととの配列も示されている (図11(B)、図11(D))。

【0094】免疫グロブリンドメインの最も重要な特徴

付の1つは $\beta$ シートサンドイッチを安定化するBおよびF $\beta$ ストランドを架橋するジスルフィド結合システインであり; ICAM-1においてはシステインはすべての場合に保持されているが、ロイシンが見出されるドメイン4のストランドfにおいて上記サンドイッチに面いくつかの他のV-およびC<sub>2</sub>-セットドメインに提案されたような接触を安定化している。システイン(43, 50, 52および37残基)間の距離はC<sub>2</sub>セットについて述べたとおりである。ICAM-1中の鎖間ジスルフィド結合の存在について試験するために、内皮細胞ICAM-1を還元および非還元条件下でSDS-PAGEに供した。内皮細胞ICAM-1はこれがJYまたは毛状臓細胞ICAM-1よりも小さいグリコシル化異種原性を示しMr中のシフトにより大きな感応性を示すことから使用した。従って、ICAM-1を16時間LPS(5 $\mu$ g/ml)刺激ヘソ静脈内皮細胞培養物から前述したようなイムノアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。アセトン沈降ICAM-1を0.25%2-メルカプトエタノールまたは25 mMイオドアセタミド含有のサンプルバッファー[Laemmli, U. K., *Nature* 227: 680-685 (1970)]中に再懸濁させ100°Cに5分間もたらした。サンプルをSDS-PAGE4670および銀染色4613に供した。内皮細胞ICAM-1は還元条件下で100kdの見掛けのMrを非還元条件下で96kdを示し天然ICAM-1中の鎖間ジスルフィドの存在を強く示唆していた。【0095】二次構造を予想するための一次配列の使用[Chon, P. Y. 等、*Biochem.* 13: 211-245 (1974)]は、図11(A)上方にa-gと表示され、免疫グロブリンドメインについての予想を正確に満たしまた免疫グロブリン中のストランドA-Hの各位置(図11(A)下方)に相応する各ICAM-1ドメイン中の7つの予期された $\beta$ -ストランドを示していた。ドメイン5はAおよびCストランドを欠損しているが、これらはシートの端部を形成しているので、各シートは依然として恐らくはストランドDと形成しておりいくつかの他のC<sub>2</sub>ドメインで提案されたようにストランドCの代理をしており; またBおよびFストランド間の特徴的ジスルフィド結合は影響を受けないであろう。即ち、ドメインサイズ、配列相溶性、推定ドメイン間ジスルフィド結合を形成する保持システイン、ジスルフィド結合の存在、および予想 $\beta$ シート構造の基準はすべて免疫グロブリン超遺伝子群中へのICAM-1の内在を満たしている。

【0096】ICAM-1はC<sub>2</sub>セットのNCAMおよびMAG糖たん白質と最も強く相溶性であることが判明した。このことはNCAMとMAGが共に細胞-細胞粘着を媒介するので特に重要である。NCAMはニューロン-ニューロンおよび神経-筋相互作用において重要であり[Cunningham, B.A.等、*Science* 236: 799-

806 (1987)]、またMAGはミエリン化(myelination)中のニューロン-オリゴデントロサイトおよびオリゴデントロサイト-オリゴデントロサイト相互作用において重要である[Poltorak, M.等、*J. Cell. Biol.* 105: 1893-1899 (1987)]。NCAMとMAGの細胞表面発現は神経系形成およびミエリ化中に、それぞれ、炎症におけるICAM-1の調整された誘起と類似して発展的に調整されている[Springer, T.A.等、*Ann. Rev. Immunol.* 5: 223-252 (1987)]。ICAM-1、NCAM[Cunningham, B.A.等、*Science* 236: 799-806 (1987)]、およびMAG[Salzer, J. L. 等、*J. Cell. Biol.* 104: 957-965 (1987)]は全体構造並びに相溶性において類似している。何故ならば、各々はN末端細胞外領域を形成する5つのC<sub>2</sub>ドメインから構成された完全膜糖たん白質であるからである。ただし、NCAMにおいては、ある追加の非Ig様配列が最後のC<sub>2</sub>ドメインとトランスメンブランダメイン間に存在する。ICAM-1はトランスメンブランダメインを含むその全体長に亘ってNAGと21%の同一性を有して列んでおり; 同じ%同一性がICAM-1とNCAM-1の5つのドメインを比較したとき見出される。ICAM-1とMAGの二次構造の図式的比較は図12に示している。ドメイン対ドメインの比較はICAM-1とNCAM内のドメイン間の相溶性のレベル(それぞれ、 $\times \pm s. d.$  21 $\pm$ 2.8%および18.6 $\pm$ 3.8%)はICAM-1ドメインをNCAMおよびMAGドメインと比較したときの相溶性のレベル(それぞれ、20.4 $\pm$ 3.7%および21.9 $\pm$ 2.7%)と同じであることを示している。NCAM[Cunningham, B.A.等、*Science* 236: 799-806 (1987); Barthels, D.等、*EMBO J.* 6: 907-914 (1987)]およびMAG[Lai, C. 等、*Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 84: 4377-4341 (1987)]のC-末端領域における別の総合的証拠は存在するけれども、これが内皮またはHL-60 ICAM-1クローンのシーケンシングにおいてあるいは種々のタイプのICAM-1たん白質バックボーンおよびプレカーサーの研究[Dustin, M. L. 等、*J. Immunol.* 137: 245-254 (1986)]において見出されたという証拠はない。

【0097】ICAM-1は多くの種々の細胞種とのリンパ球相互作用におけるLFA-1用のリガンドとして機能する。リンパ球は人工膜2重層に含まれたICAM-1と結合し、これはリンパ球上にLFA-1を必要としICAM-1とLFA-1の相互作用を直接示唆している[Marlin, S.D.等、*Cell* 51: 813-819 (1987)]。LFA-1は白血球インテグリンであり免疫グロブリン様特徴を有しない。白血球インテグリンは1種のインテグリン亜族を含む。他の2つの亜族は細胞マトリックス相互作用を媒介し、フィブロネクチン

ン、ヒトロネクチン、コラーゲンおよびフィブリノーゲンを包含するそのリガンド内の配列RGDを認識する〔Hynes, R.O., Cell 48: 549-554 (1987); Ruoslahti, E. 等, Science 238: 491-497 (1987)〕。白血球インテグリンは白血球上のみに発現し、細胞-細胞相互作用に含まれ、わずかに公知のリガンドはICAM-1と $iC_3b$  (即ち免疫グロブリン様特徴を示さない補体成分 $C_3$ のフラグメント)であり、Mac-1によって認識される〔Kishimoto, T.K.等, Leukocyte Typing III, McMillan, M. 編, スプリングー ベルラーク、ニューヨーク、(1987); Springer T.A. 等, Ann. Rev. Immunol. 5: 223-252 (1987); Anderson, D.C.等, Ann. Rev. Med. 38: 175-194 (1987)〕。配列分析により、LFA-1により認識されるICAM-1配列内の潜在的ペプチドは表9に示す。

【0098】

【表9】表 9

LFA-1に認識され得るICAM-1内のポリペプチド

-L-R-G-E-K-E-L-

-R-G-E-K-E-L-K-R-E-P-

-L-R-G-E-K-E-L-K-R-E-P-A-V-G-E-P-A-E-

-P-R-G-G-S-

-P-G-N-N-R-K-

-Q-E-D-S-Q-P-M-

-T-P-E-R-V-E-L-A-P-L-P-S-

-R-R-D-H-H-G-A-N-F-S-

-D-L-R-P-Q-G-L-E-

ICAM-1はインテグリンに結合する免疫グロブリン超遺伝子群の1員の最初の例である。これらの群の双方は細胞粘着において重要な役割を発揮するけれども、両者間の相互作用は以前には予期されてなかった。これに対し、免疫グロブリン超遺伝子群内の相互作用は全く一般的である。インテグリンと免疫グロブリン群との間の相互作用のさらなる例が発見されるであろうことは全く可能である。LFA-1はICAM-1とは異なるリガンドを認識し〔Springer T.A. 等, Ann. Rev. Immunol. 5: 223-252 (1987)〕、白血球インテグリンMac-1は好中球-好中球粘着の $C_3bi$ と異なるリガンドを認識する〔Anderson, D.C.等, Ann. Rev. Med. 38: 175-194 (1987)〕。さらにまた、精製したMAG含有ベシクルはMAGであるニューリット(neurites)に結合し、かくしてMAGは異種レセプターと異好性相互作用可能でなければならない〔Poltorak, M.等, J. Cell. Biol. 105: 1893-1899 (1987)〕。

【0099】神経-神経および神経-筋肉相互作用におけるNCAMの役割は同種親和性NCAM-NCAM相互作用に基づくことは示唆されている。〔Cunningham,

B.A.等, Science 236: 799-806 (1987)〕。ミエリン鞘形成中に軸索を取り囲むシュヴァン細胞の隣近回転ループ間の相互作用におけるMAGの重要な役割は異種レセプターとの相互作用または同種親和性MAG-MAG相互作用に基づき得る。NCAMとの相溶性および免疫グロブリン超遺伝子群内でのドメイン-ドメイン相互作用の頻繁な出現はICAM-1が同種親和性相互作用並びにICAM-1-LFA-1異好性相互作用に係わり得る可能性を引き起こす。しかしながら、同様な密度のLFA-1とICAM-1を共発現するBリンパ芽球細胞の人工または細胞単一層中のICAM-1への結合はBリンパ芽球のLFA-1 MAbによる前処理によって完全に抑制され得るが、粘着はICAM-1 MAbによるBリンパ芽球前処理による影響はない。ICAM-1 MAbによる単一層の前処理は結合を完全に壊滅させている〔Dustin, M. L. 等, J. Immunol. 137: 245-254 (1986); Marlin, S. D. 等, Cell, 51: 813-819 (1987)〕。これらの知見はICAM-1同種親和性相互作用が全く起した場合、その作用はLFA-1との異好性相互作用よりもかなり弱くなければならないことを示している。

【0100】白血球インテグリンが基本的に異なる方法でリガンドを認識する可能性はリガンド結合において重要でありRGD認識性インテグリン中には存在しないそれらの $\alpha$ サブユニット中の180残基配列の存在と一致する〔Corbi, A. 等, EMBO J. 6: 4023-4028 (1987)〕。Mac-1は $iC_3b$  5086中に存在するRGD配列を認識することが提示されているけれども、ICAM-1中にはRGD配列はない(図8~図10)。これはフィブロネクチンペプチドGRGDSPとコントロールペプチドGRGESPGがICAM-1-LFA-1粘着を抑制できないことと一致している〔Marlin, S. D. 等, Cell, 51: 813-819 (1987)〕。しかしながら、PRGGSおよびRGEEKのような関連配列はICAM-1中に、それぞれ、ドメイン2の $\beta$ -ストランドaとbおよびドメイン2のcとd間のループに予示される領域において存在しており(図11)、従って、認識について受け入れられ得る。興味あることは相溶性MAG分子がドメイン1と2の間にRGD配列を含むことである〔Poltorak, M. 等, J. Cell. Biol. 105: 1893-1899 (1987); Salzer, J. L.等, J. Cell. Biol. 104: 957-965 (1987)〕。

【0101】実施例 19

サウザンおよびノーザンブロット

サウザンブロットを3種の細胞系から抽出した5 $\mu$ gの遺伝子DNAを用いて行なった。BL2、パーキッリンバ腫細胞系(Dr. Gilbert Lenoirから供与); JYおよびEr-LCL, EBV形質転換Bリンパ腫様細

胞系。各DNAを5×製造者が推奨する量のBamH IとEcoR Iエンドヌクレアーゼ（ニューイングランド バイオラブス社）で消化した。0.8%アガロースゲルによる電気泳動に続いて、DNAをナイロン膜（ゼータプローブ、バイオラド社）に移した。フィルターを予備ハイブリッド化および $\alpha$ - $(^{32}\text{P})$ d XTP'sで標識したHL-60からのICAM cDNAを用いての標準手法に従ってランダムプライミングによりハイブリッド化した。ノウサンプロット20 $\mu\text{g}$ の全DNAまたは6 $\mu\text{g}$ のポリ(A)+RNAを用いて行なった。RNAは変性し1%アガロースホルムアルデヒドゲルにより電気泳動し、ゼータプローブに電気移動させた。各フィルターを予備ハイブリッド化し $^{32}\text{P}$ 標識オリゴヌクレオチドプローブ（前述の）のHL-60 cDNAプローブを用いて前述したようにしてハイブリッド化した〔Stauton, D. B.等、Embo J. 6; 3695-3701 (1987)〕。

【0102】3kb cDNAプローブおよびBamH IとEcoR Iで消化した遺伝子DNAを用いたサウザンプロットはそれぞれが単一遺伝子を示したコード化情報の殆どが8kb内に存在することを示す20および8kbの単一主要ハイブリッド化性フラグメントを示した。3種の細胞系のプロットにおいては、制限フラグメント多形性の証拠はなかった。

#### 実施例20

##### ICAM-1遺伝子の発現

“発現ベクター”は、（適当な転写性および／またはほん訳性コントロール配列の存在に基づき）ベクターにクローニングされるDNA（またはcDNA）を発現し得、それによってポリペプチドまたはたん白質を産生し得るベクターである。クローニングした配列の発現は発現ベクターを適当な宿主細胞に組み込んだときに起る。原核細胞発現ベクターを用いる場合は、適当な宿主細胞はクローニングした配列を発現し得る任意の原核細胞であろう。同様に、真核発現ベクターを用いる場合、適当な宿主細胞はクローニングした配列を発現し得る任意の真核細胞である。重要なことは真核DNAは介在配列を含み得るので、またそのような配列は原核細胞中では正確に加工できないので、原核ゲノム発現ベクターライブラリーを産生するためには、ICAM-1を発現し得る細胞からのcDNAを用いることが好ましい。cDNAを調製する方法およびゲノムライブラリーを産生する方法はManiatis, J.等により開示されている〔Molecular Cloning: A Laboratory Manual, コールド スプリング ハーバー プレス社、コールド スプリング ハーバー、NY (1982)〕。

【0103】上述の発現ベクターゲノムライブラリーを用いて宿主細胞のバンクを創生する（その各々はライブラリーの1員を含む）。発現ベクターは宿主細胞に任意の種々の手段によって組み込みし得る（即ち、形質

転換、トランスフェクション、原形質体融合、エレクトロポレーション等）。発現ベクター含有細胞のバンクはクローン的に増殖させ、その各員は個々にアッセイして（イムノアッセイを用いて）これらが抗ICAM-1抗体に結合し得るかどうかを測定する。抗ICAM-1抗体に結合し得るたん白質を産生する細胞の発現ベクターはさらに分析してこれらのベクターが全ICAM-1遺伝子を発現（または含有）するかどうか、ICAM-1遺伝子のフラグメントのみを発現（または含有）するかどうかあるいは生成物が免疫学的にICAM-1に関係したとしてもICAM-1ではない遺伝子を発現（または含有）するかどうかを決定する。そのような分析は任意の都合の良い方法で行なってよいけれども、好ましいのは発現ベクターにクローニングされるDNAまたはcDNAのヌクレオチド配列を決定することである。そのようなヌクレオチド配列を検査してICAM-1のトリプシン消化フラグメント（表5）と同じアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードし得るかどうかを決定する。

【0104】ICAM-1遺伝子をコードするDNAまたはcDNA分子を含む発現ベクターは、かくして、（i）抗ICAM-1抗体に結合し得るたん白質の発現を行なう能力；および（ii）ICAM-1のトリプシンフラグメントの各々をコードし得るヌクレオチド配列の存在によって認識し得る。そのような発現ベクターのクローニングDNA分子は発現ベクターから取り出して純粋な形で単離できる。

#### 実施例21

##### 精製ICAM-1の機能活性

細胞中では、ICAM-1は細胞膜と会合した表面たん白質として通常は機能する。従って、精製ICAM-1の機能は分子を人工脂質膜（リボソームまたはベシクル）中にたん白質を洗浄剤可溶性脂質中に溶解し次いで洗浄剤を透析により除去することによって再構成させたのち試験した。JY細胞から精製し洗浄剤オクチルグリコシド中に上述のようにして溶出したICAM-1をベシクル中に再構成し、ICAM-1含有ベシクルをガラスカバースリップまたはプラスチック培養ウェルに融合させたたん白質に結合する細胞の検出をできるようにした。

##### 【0105】平坦膜およびプラスチック結合ベシクルの調製

ベシクルはGay等の方法により調製した〔J. Immunol. 136; 2026 (1986)〕。即ち、タマゴホスファチジルクロリンとコレステロールをクロロホルム中に溶解し7:2のモル比で混合した。脂質混合物をチッ素ガス流下に回転させながら薄膜に乾燥させ、次いで1時間で凍結乾燥させてすべての痕跡量のクロロホルムを除去した。脂質膜を1%オクチルグリコシド/0.14M NaCl / 20 mM トリス (pH7.2) 中にホスファチジル



クロリン最終濃度0.1 mMに溶解した。約10  $\mu$ gの精製ICAM-1またはコントロール膜糖たん白質としてのヒトグリコホリン(シグマケミカル社、セントルイス、MO)を溶解脂質の各mlに加えた。たん白質-脂質-洗浄剤溶液を200容量の20 mMトリス/0.14 M NaCl、pH7.2の3回交換およびHBSSの1回交換に対して4℃で透析した。

【0106】平坦膜はBrian等の方法により調製した(Proc. Natl. Acad. Sci., 81:6159(1984))。ガラスカバースリップ(直径11mm)を17×洗浄剤(Linbro)の1:6希釈液中で15分間煮沸し、一夜蒸留水中で洗浄し、70%エタノール中に浸し、風乾させた。ICAM-1またはグリコホリンのいずれを含有するベシクル懸濁液の80  $\mu$ l小滴を24ウェルクルスタープレーートのウェル底部に入れ、上記で調製したガラスカバースリップを静かに頂部に浮かした。室温での20~30分のインキュベーション後、ウェルをHBSSで満たし、カバースリップをひっくり返して平坦面を上向きにした。次いでウェルをHBSSで十分洗浄して未結合ベシクルを除去した。平坦膜表面は全く空気にさらさなかった。

【0107】ガラス表面に融合させた平坦膜による実験途中で、ICAM-1を含むベシクルはマルチウェル組織培養プレートのアラスチック表面に直接結合し、特異的細胞結合により明らかなような機能活性を保持していることが判明した。そのようなベシクルは以後“プラスチック結合ベシクル(PBV)”と称する。というのは、プラスチックに結合した脂質ベシクルの性質を測定するのではないからである。プラスチック結合ベシクルは30  $\mu$ lのベシクル懸濁液を直接96ウェル組織培養トレイ(ファルコン)中のウェル底部に加え次いで平坦膜について述べたようにしてインキュベーションおよび洗浄を行うことによって調製した。

#### 細胞粘着アッセイ

平坦膜またはプラスチック結合ベシクルを用いた細胞粘着アッセイの両方を本質的に同じ方法で行ったが、PBVアッセイの細胞数および容量は平坦膜アッセイに用いたものの1/5に減じた。

【0108】正常コントロールおよびLFA-1を発現できない白血球粘着欠損(LAD)患者(Anderson, D. C.等、J. Infect. Dis. 152:668(1985))からのTリンパ球を、1  $\mu$ g/mlのコンカナバリン-A(Con-A)を含む末梢血単核細胞をRPMI-1640+20%FCS中で5×10<sup>5</sup>細胞/mlで3日間培養することによって調製した。次いで、細胞をRPMIで2回;5 mMメチルーアルファーマノフィラノシドで1回洗浄して残留レクチンを細胞表面から除去した。細胞を1 ng/mlの組換えIL-2を含むRPMI/20%FCS中で増殖させ、培養開始後10および22日の間で使用した。平坦膜またはPBVに結合す

る細胞を検出するため、Con-A芽球、T-リンパ腫SKW-3、EBV形質転換B-リンパ腫様細胞系JY(LFA-1陽性)およびLFA-1欠損リンパ腫様細胞系(BBN)(患者1由来、Springer, T.A.等、J. Exp. Med. 160:1901-1918(1986))を1mlのRPMI-1640/10%FCS中の1×10<sup>7</sup>細胞を100  $\mu$ CiのNa<sup>51</sup>CrO<sub>4</sub>で37℃、1時間インキュベートし、次いでRPMI-1640で4回洗浄し未結合標識を除去することによって放射性標識させた。モノクローナルブロッキング試験においては、細胞またはプラスチック結合ベシクルはRPMI-1640/10%FCS中の20  $\mu$ g/mlの精製抗体で4℃にて30分間前処理し、次いで4回洗浄して未結合抗体を除去した。細胞結合に関しての2価イオンの効果の実験においては、細胞をCa<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>を含まないHBSS+10%透析FCSで1回洗浄し、CaCl<sub>2</sub>とMgCl<sub>2</sub>を決められた濃度に加えた。すべての実験において、細胞および平坦膜またはPBVは適当な温度(4℃、22℃または37℃)で適当なアッセイバッファー中で予備平衡させた。

【0109】精製ICAM-1に結合する細胞を測定するために、<sup>51</sup>Cr標識細胞(平坦膜アッセイでの5×10<sup>5</sup>EBV形質転換体;PBVアッセイでの1×10<sup>5</sup>EBV形質転換体またはSKW-3細胞、2×10<sup>5</sup>Con-A芽球)を平坦膜またはPBV上で25 Xgで2分間遠心し、次いで4℃、22℃または37℃で1時間インキュベーションした。インキュベーション後、未結合細胞を適当な温度での予備平衡させたバッファーによる充填、吸引の8回のサイクルによって除去した。結合細胞はウェル内容物の0.1 N NaOH/1%トリトンX-100による可溶化およびガンマカウンターでの計数によって定量した。%細胞結合は結合細胞からのcpmを入力と細胞のcpmで割ることによって決定した。平坦膜アッセイにおいては、入力cpmはカバースリップの表面積を培養ウェルの表面積と比較した比に対して集めた。

【0110】これらのアッセイにおいて、EBV形質転換Bリンパ腫細胞、SKW-3T-リンパ腫細胞、およびCon-A Tリンパ芽球は人工膜中のICAM-1に特異的に結合した(図13および図14)。結合は、細胞が等価の量の他のヒト細胞表面糖たん白質グリコホリンを含んだコントロールの平坦膜またはベシクルに極めて貧弱にしか結合しなかったことから特異的であった。さらにまた、LFA-1陽性EBV形質転換体およびCon-A芽球も結合したが、それらのLFA-1陰性等価物は何ら有意の程度に結合せず、結合が細胞上のLFA-1の存在に依存していることを示した。細胞結合の特異性および細胞LFA-1への依存性の両方はモノクローナル抗体のブロッキング試験において確認した(図15)。JY細胞の結合はICAM-1含有PBVを抗ICAM-1モノクローナル抗体RR1/1前処理したと

き97%まで抑制できた。同じ抗体による細胞の前処理は殆ど効果がなかった。逆に、抗LFA-モノクローナル抗体TS 1/18は96%まで結合を抑制したがPBVでなく細胞を前処理したときはわずかであった。LFA-3と反応性のコントロール抗体TS 2/9(異なるリンパ球表面抗原)は前処理またはPBVのいずれを前処理したときも有意の抑制効果はなかった。この実験は人工膜の若干量の不純物のないICAM-1自体が観察された細胞粘着を媒介していることおよび粘着は結合性細胞上のLFA-1に依存していることを示している。

【0111】人工膜中のICAM-1への細胞の結合もLFA-1依存性粘着系の2つの他の特性:温度依存性と2価カチオンの必要性を示した。図16に示すように、Con-A芽球はPBV中のICAM-1に37℃で最も効果的に、22℃で部分的に、4℃で極めて貧弱に結合した。図17に示すように、結合は完全に2価カチオンの存在に依存している。生理学上の濃度においては、 $Mg^{2+}$ は単独で最高の細胞結合を示したが、 $Ca^{2+}$ の単独は極めて低レベルの結合を示した。しかしながら、 $Ca^{2+}$ と組合せた通常濃度の1/10の $Mg^{2+}$ は共働効果を有し最高の結合を示した。要約すれば、人工膜中に混入させた精製ICAM-1に対する細胞結合の特性性、モノクローナル抗体による特異的抑制、および温度および2価カチオンの必要性はICAM-1がLFA-1依存

性の粘着系の特異的リガンドであることを示している。

#### 【0112】実施例22

アレルギーおよび毒性パッチ試験反応におけるICAM-1とHLA-DRの発現

5人の正常人の皮膚生検をそのICAM-1およびHLA-DRについて行った。ある血管中の内皮細胞は通常ICAM-1を発現するけれども、正常皮膚からのケラチン細胞にはICAM-1は発現しないことが判った。正常皮膚生検からの任意ケラチン細胞上のHLA-DRの染色は観察されなかった。ICAM-1とクラスII抗原の発現動力学をアレルギー性および毒性皮膚傷害の生検の細胞において検討した。検討した6人の対象者の半数がハプテンの適用後4時間でICAM-1を発現したケラチン細胞を有していることが判った(表10)。ハプテンへの露出時間によりケラチン細胞上にICAM-1を発現する人の割合が増大し、また48時間までにケラチン細胞当たりより多くのICAM-1発現を示す染色強度も増大した。事実、この時点で、すべての生検のケラチン細胞の部分がICAM-1に対して陽性に染色した。72時間(ハプテン除去後24時間)で、8人の対象者の7人のケラチン細胞にICAM-1を発現しており、1人の対象者のICAM-1発現は48~72時間の間に弱くなった。

#### 【0113】

【表10】

表 10  
アレルギーパッチ試験生検からのケラチン細胞上の  
ICAM-1およびHLA-DRの誘起の動力学

パッチ適用 後の時間	生検の数	ICAM-1 のみ	HLA-DR のみ	ICAM-1と HLA-DR
正常皮膚	5	0	0	0
アレルギー パッチ試験				
4	6	3 <sup>a</sup>	0	0
8	9	3	0	0
24	8	7	0	0
48 <sup>b</sup>	8	5	0	3
72	8	6	0	1

<sup>a</sup> サンプルは少なくとも小群のケラチン細胞が染色した場合に陽性とみなした。

【0114】<sup>b</sup> すべてのパッチはこの時点で除去した。

組織学上、ハプテンの適用後4時間で採取した生検からのケラチン細胞上のICAM-1の染色像は通常小群生状であった。48時間後、ICAM-1はケラチン細胞の大部分の表面上に発現し、傷害の中心および周辺間に

差異はなかった。染色強度はケラチン細胞が爪角質層に近づいたとき減少した。これは傷害の中心および周辺から採られた生検において見いだされた。また、この時間でも、パッチ試験は陽性であった(浸潤、紅斑、小胞)。異なるハプテンを感受性個人に適用してもICAM-1発現における差異は見られなかった。ケラチン細胞以外にも、ICAM-1は傷害部位のいくつかの単核細胞および内皮細胞上にも発現した。

【0115】アレルギー皮膚傷害のケラチン細胞上でのHLA-DRの発現はICAM-1の発現よりも頻度は小さかった。検討した対象者のうち、ハブテン適用後24時間までにHLA-DRに陽性に染色したケラチン細胞による傷害を有するものはなかった。事実、わずかに4人の生検サンプルがHLA-DRを発現したケラチン細胞を有するに過ぎず、HLA-DRに陽性でICAM-1に陽性でないケラチン細胞を有する生検はなかった。アレルギーパッチ試験傷害と対照的に、はず油またはラウリル硫酸ナトリウムで誘発させた毒性パッチ試験傷害は試験のすべての時点でその表面にICAM-1を殆ど示さないケラチン細胞を有していた。実際に、パッチ適用後48時間で、これはアレルギー性パッチ試験対象者における最適の時点であるが、14人の毒性パッチ

試験対象者のうちの1人が傷害中にICAM-1を発現するケラチン細胞を有していた。また、アレルギー性パッチ試験生検と対照的に、毒性パッチ試験傷害のケラチン細胞上にHLA-DRは発現しなかった。

【0116】これらのデータはICAM-1が免疫系炎症中で発現し毒性系炎症では発現しないことを示しており、かくして、ICAM-1の発現は、疾患が免疫抑制治療剤の拒絶または尿毒性によるのかどうかの判断が難しい場合の急性腎疾患のような免疫系および毒性系炎症を区別するのに使用できる。腎生検およびICAM-1発現の向上の評価が免疫系拒絶と非免疫系毒性反応の区別を可能にするであろう。

【0117】

【表11】

表 11

毒性パッチ試験生検からのケラチン細胞上の  
ICAM-1およびHLA-DRの誘起動力学

パッチ適用 後の時間(hr)	生検の数	ICAM-1 のみ	HLA-DR のみ	ICAM-1と HLA-DR
4	4	4	0	0
8	3	3	1 <sup>a</sup>	0
24	3	3	1	0
48 <sup>b</sup>	14	14	1	0
72	3	3	1	0

<sup>a</sup> サンプルは少なくともケラチン細胞の小群が染色された場合陽性とみなした。

【0118】<sup>b</sup> すべてのパッチはこの時点で除去した。

#### 実施例23

良性皮膚病中のICAM-1とHLA-DRの発現種々のタイプの炎症性皮膚病を有する患者からの傷害の皮膚生検からの細胞をそのICAM-1とHLA-DRの発現について検討した。アレルギー性接触湿疹、天疱瘡、および扁平苔癬の生検中のケラチン細胞の一部はICAM-1を発現した。扁平苔癬は48時間アレルギー性パッチ試験生検で見られた結果と同等か幾分強い像による最も強く染色を示した(図14)。アレルギー性パッチ試験の結果と同様に、最も強いICAM-1染色は

高単核細胞浸潤部位で見られた。さらにまた、試験した11の扁平苔癬生検のうちの8つはケラチン細胞上でHLA-DR発現について陽性であった。

【0119】発振とじんま疹を有する患者の皮膚生検からのケラチン細胞上のICAM-1の発現は少なかった。これらの疾患を有する試験した7人の患者のうち4人のみが傷害部位でICAM-1を発現したケラチン細胞を有していた。HLA-DR発現は1人の患者においてのみであり、これはICAM-1と関連していた。試験した良性炎症皮膚病のすべてからの内皮細胞および単核細胞浸潤の部分は変化度合でICAM-1を発現していた。

【0120】

【表12】

表 12

良性皮膚病からのケラチン細胞上の  
ICAM-1とHLA-DRの発現

診 断	生検数	ICAM-1のみ	HLA-DRのみ	ICAM-1とHLA-DE
アレルギー性 接触湿疹	5	3 <sup>a</sup>	0	2
扁平苔癬	11	3	0	8

天疱瘡	2	2	0	0
発疹	3	2	0	0
じんま疹	4	1	0	1

・ サンプルは少なくともケラチン細胞の小群が染色された場合陽性とみなした。

#### 実施例24

悪性皮膚病中の ICAM-1 と HLA-DR の発現  
 良性皮膚状態からの傷害とは異なり、悪性皮膚傷害からのケラチン細胞上の ICAM-1 の発現は変化に富んでいた(表13)。試験した皮膚T細胞リンパ腫23例のうち、ICAM-1 陽性ケラチン細胞は14例のみにて同定された。菌状肉腫腫瘍の生検からのケラチン細胞では、病気の進行がより前の段階に進むにつれて

その ICAM-1 発現を消失する傾向にあった。しかしながら、ICAM-1 発現は皮膚T細胞リンパ腫傷害の殆どからの変化割合の単核細胞浸潤上に見られた。試験した残りのリンパ腫のうちでは、8つのうち4つが ICAM-1 を発現したケラチン細胞を有していた。試験した悪性皮膚病を有する29人の患者のうち、5例は ICAM-1 を発現することなしに HLA-DR を発現したケラチン細胞を有していた。

【0121】

【表13】

表 13

悪性皮膚病からのケラチン細胞上の  
 ICAM-1 および HLA-DR の発現

診 断	生検数	ICAM-1のみ	HLA-DRのみ	ICAM-1とHLA-DE
CTCL, MFI	8	1 <sup>a</sup>	0	4
CTCL, MFII-III	10	1	2	5
CTCL, SS	3	1	0	2
CTCL, ラージ細胞	2	0	2	0
CBCL	2	0	0	1
皮膚白血病	3	1	1	1
ヒストサイト X	1	0	0	0

・ サンプルは少なくともケラチン細胞の小群が染色された場合陽性とみなした。

#### 実施例25

ヒト末梢血単核細胞の増殖上の抗 ICAM-1 抗体の効果

ヒト末梢血単核細胞を抗原またはマイトジェンの存在および認識より誘起させ増殖させる。マイトジェン、コンカナバリンAまたはT細胞結合性抗体の OKT<sub>3</sub> のようなある種の分子は末梢血単核細胞の非特異的増殖を引き起こす。

【0122】ヒト末梢血単核細胞はこれらが特異的抗原を認識し得る細胞の細群体群(subpopulation) からなる点で不均質である。特定の特異抗原を認識し得る末梢血単核細胞がその抗原に出会った場合、単核細胞の上記細群体群の増殖は誘起される。破傷風トキシイドおよびキーホールリンベットヘモシアニン(10g/ml)または破傷風トキシイド(供給源からの希釈1:100)を上記のようにして培養した細胞中に抗 ICAM-1 抗体(R6-5-D6;最終濃度5g/ml)の存在または不存在下に加えた。細胞はアッセイが終了する前の3.5日(コンカナバリンA試験)、2.5日(OKT<sub>3</sub>試験)、または5.5日(キーホールリンベットヘモシアニンおよび破傷風トキシイド試験)で培養した。アッセイ終了前18時間で、2.5μCiの<sup>3</sup>H-チミジンを培養物に加えた。細胞増殖を末梢血単核細胞によりDNAへのチミジンの取り込みを測定することによってアッセイした。取り込まれたチミジンを集め液体シンチレーションカウンター中

11-Paque, フェルマシア社)で製造者が推奨するような勾配で精製した。界面を集めた後、細胞をRPMI1640培地で3回洗浄し平底96ウェルマイクロタイタープレート中で10%ウシ胎児血清、2mMグルタミンおよびジェンタマイシン(50μg/ml)を含むRPMI1640培地中で10<sup>6</sup>細胞/mlの濃度で培養した。

【0123】抗原、T細胞マイトジェン、コンカナバリンAのいずれか(0.25μg/ml); T細胞結合性抗体OKT<sub>3</sub>(0.001μg/ml); キーホールリンベットヘモシアニン(10g/ml)または破傷風トキシイド(供給源からの希釈1:100)を上記のようにして培養した細胞中に抗 ICAM-1 抗体(R6-5-D6;最終濃度5g/ml)の存在または不存在下に加えた。細胞はアッセイが終了する前の3.5日(コンカナバリンA試験)、2.5日(OKT<sub>3</sub>試験)、または5.5日(キーホールリンベットヘモシアニンおよび破傷風トキシイド試験)で培養した。アッセイ終了前18時間で、2.5μCiの<sup>3</sup>H-チミジンを培養物に加えた。細胞増殖を末梢血単核細胞によりDNAへのチミジンの取り込みを測定することによってアッセイした。取り込まれたチミジンを集め液体シンチレーションカウンター中

で計数した〔Merluzzi等、*J. Immunol.* 139:166-168(1987)〕。これらの実験の結果は図18(コンカナバリンA試験)、図19(OKT<sub>3</sub>試験)、図20(キーホールリンペットヘモシアニン試験)、および図21(破傷風トキソイド試験)に示す。

【0124】抗ICAM-1抗体は単核細胞中の非特異T-細胞マイトジェン、Con A; 非特異的T-細胞会合抗原、OKT-3; および特異抗原、キーホールリンペットヘモシアニンおよび破傷風トキソイドに対する増殖的応答を抑制することが判明した。抗ICAM-1抗体による抑制は抗LFA-1抗体の抑制効果と匹敵し、ICAM-1はLFA-1の官能性リガンドであることおよびICAM-1のアンタゴニストは特異的防御系応答を抑制するであろうことを示唆している。

#### 実施例26

乾癬皮膚傷害のケラチン細胞上のICAM-1発現  
乾癬を有する5例の患者からの皮膚生検中のICAM-1発現を開始前およびPUVA治療の途中で周期的に検討した。生検は組織学によって確認した古典的乾癬を有する5例の患者から得た。生検は実質的にPUVA治療の前および指示された時間中に採取した。PUVAは週に3~4回投与された。生検は5例の患者の乾癬斑の周囲から採取し、生検以外に、これら患者の4人の臨床的に正常な皮膚からも採取した。

【0125】新しい皮膚生検試料を凍結した液体窒素中に保存した。6ミクロンの保存切片を一夜室温で風乾し、アセトン中で10分間固定し、直ちに染色またはアルミニウムホイルで包み染色するまで-80℃で保存した。染色は次の方法で作った。切片をモノクローナル抗体でインキュベートし、ジアミノベンジジン H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、基質を用いて3段階イムノパーオキシダーゼ法により染色した〔Stein, H. 等、*Adv. Cancer Res.* 42:67-147、(1984)〕。へん桃腺およびリンパ節を抗ICAM-1およびHLA-DR染色用の陽性コントロールとして用いた。一次抗体の不存在下で染色した組織は陰性コントロールであった。HLA-DRに対するモノクローナル抗体を Becton Dickinson 社(カリフォルニア州マウンテンビュー)から購入した。抗ICAM-1モノクローナル抗体はR6-5-D6であった。パーオキシダーゼ-コンジュゲートウサギ抗マウスIgおよびパーオキシダーゼ-コンジュゲートブタ抗ウサギIgはスウェーデン、コペンハーゲンの DAKAPATTSより購入した。ジアミノベンジジン-テトラヒドロクロリドはシグマ社(セントルイス)より得た。

【0126】試験の結果は数種の血管の内皮細胞が疾患および正常皮膚の両方でICAM-1を発現していることを示したが、染色強度およびICAM-1を発現する血管の数は乾癬皮膚傷害内で増大した。さらに、5例の患者からの未治療乾癬皮膚傷害のケラチン細胞中のICAM-1の発現像はわずかに少量の細胞染色から多数の

ケラチン細胞が染色されているまでに変化した。PUVA治療の途中では、患者の2人(患者2と3)のICAM-1発現は臨床的軽快さに先行しあるいは一致した著しい低減を示した。患者1、4および5は、それぞれ、臨床的軽快あるいは悪化に関連してPUVA治療中ICAM-1発現を減少あるいは増大させた。PUVA治療前後の正常皮膚からのケラチン細胞上にICAM-1発現はなかった。このことはPUVAは正常皮膚からのケラチン細胞上にICAM-1を誘起しないことを示している。

【0127】注目すべきことは単核細胞浸潤密度はケラチン細胞上のICAM-1発現量と関連していることであった。このことはICAM-1発現も弱まったときPUVA治療中の傷害中の単核細胞の数も減少することおよびケラチン細胞上のICAM-1発現がより顕著になったときPUVA治療中単核細胞の数が増大することの両方に関係している。内皮細胞および皮膚単核細胞はまたICAM-1陽性である。臨床的に正常な皮膚においては、ICAM-1発現はケラチンの標識化なしで内皮細胞に確認された。ケラチン細胞上のHLA-DRの発現は可変的であった。ICAM-1陽性でないHLA-DR陽性生検は存在しなかった。要約すれば、これらの結果は、治療前では、ICAM-1発現はケラチン細胞上で高く、単核細胞浸潤密度と相関していることを示している。PUVA治療中は、ICAM-1染色の著しい減少が臨床的改善と平行して見られる。組織学上でも、皮膚浸潤は消失した。臨床的悪化が治療中に見られる場合には、ケラチン細胞上のICAM-1の発現並びに皮膚浸潤密度も増大した。臨床的軽快が治療中に見られたときは、ケラチン細胞上のICAM-1染色における一致した減少並びに皮膚浸潤の減少があった。即ち、ケラチン細胞上のICAM-1の発現は皮膚の単核細胞浸潤密度に相応する。これらのデータはPUVA治療に対する臨床的応答は単核細胞のよりおだやかな下降と平行してケラチン細胞上のICAM-1発現のはっきりした減少をもたらすことを示している。このことはケラチン細胞上のICAM-1発現が皮膚浸潤の開始および持続に応答性であること、および行なわれたPUVA治療はICAM-1を調整し皮膚浸潤および炎症応答を緩和していることを示している。データはまたPUVA治療中のケラチン細胞上に可変性のHLA-DRがあったことも示している。

【0128】乾癬傷害のケラチン細胞上のICAM-1発現は傷害臨床上の厳格さおよび皮膚浸潤の大きさと関連している。即ち、ICAM-1は乾癬において中心的役割を発揮し、その発現の抑制および/またはその単核細胞上でのCD18コンプレックスとの相互作用の抑制は本病変の有効な治療となるであろう。さらにまた、ケラチン細胞上のICAM-1発現をモニターすることは乾癬の診断、予防、および治療経過を評価するため有効

な手段となるであろう。

【表14】

【0129】

表 14

PUVA治療中および治療前の乾癬皮膚傷害および臨床的に  
正常な皮膚のケラチン細胞による ICAM-1 発現

PUVA治療前お よび中の時間	患 者 No.									
	1	2		3		4		5		
	PS	PS	N	PS	N	PS	N	PS	N	
0	+	+	-	++	-	++	-	+++	-	
1日	+									
1週	+	+	-	-	-	++	-	+	-	
0										
2週	++			+	-	+	-	+	-	
3週	++									
				*		0				
4週	++	+	-	-	-	++	-			
		*						*		
5～6週		-	-					-	-	
								0		
7週	*					(++)	(+)	+++	-	
								*		
10週	(+)							-	-	

- +++ 多くの陽性ケラチン細胞
- ++ 部分的陽性ケラチン細胞
- +
- (+) わずかな陽性ケラチン細胞
- (+) 極めてわずかな拡散した陽性ケラチン細胞
- 陽性染色なし
- \*
- 臨床的軽快
- 0
- 〃 悪化

#### 実施例27

混合リンパ球反応についての抗 ICAM-1 の効果  
前述したように、ICAM-1 は LFA-1 依存性細胞  
粘着より媒介された免疫応答中の有効な細胞相互作用の  
ために必要である。免疫応答または炎症疾患中の ICAM-1  
の誘起は白血球の相互または内皮細胞との相互作用を  
可能にする。

【0130】2人の無関係の個人からのリンパ球を各互  
いの存在下で培養したときは、芽球形質転換およびリン  
パ球の細胞増殖が観察される。1つの集団の白血球を第  
2集団の白血球の存在へのこの応答は混合リンパ球反応  
(MLR) として公知であり、リンパ球のマイトジェン  
の添加に対する応答と類似である〔*Immunology The Sci  
ence of Self-Nonself Discrimination*, Klein, J. Joh  
n Wiley & Sons 社、NY (1982), pp 453-  
458〕。抗 ICAMモノクローナル抗体のヒト MLR  
上の効果について試験した。これらの実験は次のように  
して行った。末梢血を正常な健康ドナーから静脈穿刺に

より採取した。血液をヘパリン化チューブに集め、室温  
で Punk's G (GIBCO社) 平衡塩溶液 (BSS) で 1:1  
に希釈した。血液混合物 (20ml) を 15ml の Fico  
ll/Hypaque 密度勾配 (ファルマシア社、密度 1.078、  
室温) 上に層化し、1000 Xg で 20分間遠心した。  
次いで界面を集め、Punk's G 中で 3回洗浄した。細胞  
をヘマシトメーター上で計数し、0.5%のジェンタマイ  
シン、1 mL グルタミン (GIBCO社) および 5% 加熱  
不活化 (56℃、30分) ヒト AB 血清 (フローラボラ  
トリーズ社) とを含む RPMI-1640 培地 (GIBCO  
社) (以下、RPMI 培地と呼ぶ) 中に再懸濁させた。

【0131】マウス抗 ICAM-1 (R6-5-D  
6) をこの実験で用いた。すべてのモノクローナル抗体  
(ジャックソンイムノリサーチラボラトリーズ、ボスト  
ン、MAにより腹水から調製された) を精製 IgG 調製  
物として用いた。別々のドナーからのスチミュレーター  
細胞を 1000R で照射し、レスポンダー細胞と同じ濃  
度で培養した。培養当りの総容量は 0.2ml であった。

コントロールはレスポンダー細胞単独およびシミュレーター細胞単独を含んでいた。培養プレートを37℃で5%CO<sub>2</sub> - 湿潤空気雰囲気中で5日間インキュベートした。各ウェルを0.5  $\mu$ Ci のトリチウム化チミジン (<sup>3</sup>HT) (ニューイングランドニュクレア社) で培養の最後の18時間脈動させた。ある場合には、2通りのMLRを行った。プロトコールは第2ドナー細胞を照射により不活化されていない以外は同じであった。

【0132】細胞をガラス繊維フィルター上に自動化マルチプルサンプルハーベスタ (Skatron 社、ノルウェー) を用いて採取し、水およびメタノールですすいだ。フィルターをオープン乾燥させ、アクアゾル中でベッグ

マン (LS-3801) 液体シンチレーションカウンタで計数した。結果は6ケの個々の培養物について平均CPM $\pm$ 標準誤差として示している。表15は精製抗ICAM-1モノクローナル抗体が20 ng/ml で明らかな有意の抑制でもって投与量依存の形でMLRを抑制していた。精製マウスIgGは殆どあるいは全く抑制効果を示さなかった。抗ICAM-1モノクローナル抗体によるMLRの抑制は抗体を培養の最初の24時間以内で加えたとき生じる (表16)

【0133】

【表15】

表 15  
ワンウェイリンパ球反応についての  
抗ICAM-1抗体の効果

レスポンダー細胞 <sup>a</sup>	シミュレーター細胞 <sup>b</sup>	抗体 <sup>c</sup>	<sup>3</sup> HT取り込み(CPM)
-	-	-	445 <sup>d</sup> $\pm$ 143
-	+	-	148 $\pm$ 17
+	-	-	698 $\pm$ 72
+	+	-	42,626 $\pm$ 1,579
+	+	mIgG (10.0 $\mu$ g)	36,882 $\pm$ 1,823(14%)
+	+	mIgG (0.4 $\mu$ g)	35,500 $\pm$ 1,383(17%)
+	+	mIgG (0.02 $\mu$ g)	42,815 $\pm$ 1,246(0%)
+	+	R6-5-D6 (10.0 $\mu$ g)	8,250 $\pm$ 520 (81%)
+	+	R6-5-D6 (0.4 $\mu$ g)	16,142 $\pm$ 858 (62%)
+	+	R6-5-D6 (0.03 $\mu$ g)	28,844 $\pm$ 1,780(32%)

<sup>a</sup> レスポンダー細胞 ( $6.25 \times 10^5$  /ml )

マウスIgG (mIgG)

<sup>b</sup> スチミュレーター細胞 ( $6.25 \times 10^5$  /ml 、1000Rでの照射)

<sup>d</sup> 5~6培養物の平均 $\pm$ 標準誤差、( ) 内の数はMLRの%抑制を示す

<sup>c</sup> 最終濃度 ( $\mu$ g/ml ) でのICAM-1に対する精製モノクローナル抗体 (R6-5-D6) または精製

【0134】

【表16】

表 16  
抗ICAM-1の添加時間

R <sup>a</sup>	S <sup>b</sup>	添加 <sup>c</sup>	<sup>3</sup> HT 取り込み(CPM)
抗体または培地の添加時間			
			日 <sup>0</sup> 日 <sup>1</sup> 日 <sup>2</sup>
-	-	培地	205 <sup>d</sup> $\pm$ 14      476 $\pm$ 132      247 $\pm$ 75
-	+	培地	189 $\pm$ 16      nd <sup>e</sup> nd
+	-	培地	1,860 $\pm$ 615      nd      nd
+	+	培地	41,063 $\pm$ 2,940      45,955 $\pm$ 2,947      50,943 $\pm$ 3,072
+	+	R6-5-D6	17,781 $\pm$ 1,293      38,409 $\pm$ 1,681      47,308 $\pm$ 2,089
			(57%) <sup>f</sup> (16%)      (7%)

<sup>a</sup> レスポンダー細胞 ( $6.25 \times 10^5$  /ml )

<sup>b</sup> スチミュレーター細胞 ( $6.25 \times 10^5$  /ml )



° 培養培地またはICAM-1に対する精製モノクローナル抗体(R6-5-D6), 10 $\mu$ g/ml で日0で24時間間隔で加えた。

【0135】<sup>d</sup> 4~6培養物の平均値±標準誤差

° nd=測定せず

<sup>f</sup> %抑制

要約すれば、ICAM-1に対する抗体のMLRを抑制する能力はICAM-1モノクローナル抗体が急性移植拒絶に治療的利用性を有していることを示している。ICAM-1モノクローナル抗体はまたLFA-1/ICAM-1調整細胞-細胞相互作用に依存する関連免疫媒介不整における治療的利用性を有している。本実験はICAM-1に対するモノクローナル抗体の添加が反応に最初24時間中に加えたときに混合リンパ球反応(MLR)を抑制することを示している。さらにまた、ICAM-1はインビトロ培養中のヒト末梢血単核細胞について状態向上なる。

【0136】さらにまた、ICAM-1は静止ヒト末梢血リンパ球または単核細胞上には発現しないことが見出された。ICAM-1は単独培養細胞または混合リンパ球反応中の未調整ドナー細胞との共培養細胞の単核細胞上で、通常のフローサイトメトリック分析を用いることにより状態向上される。単核細胞上でのこのICAM-1の状態向上は炎症の指示剤として、特にICAM-1が急性または慢性炎症を有するヒトの新鮮単核細胞上で発現する場合に使用できる。活性化単核細胞に対するICAM-1の特異性およびICAM-1に対する抗体

のMLRを抑制する能力とはICAM-1モノクローナル抗体が急性移植拒絶および細胞-細胞相互作用を必要とする関連免疫媒介不整における診断上および治療上の潜在力を有し得ることを示している。

【0137】実施例28

抗ICAM-1および抗LFA-1抗体の混合投与の相乗効果

実施例27で示したように、MLRは抗ICAM-1抗体によって抑制される。MLRはまた抗LFA-1抗体によっても抑制できる。抗ICAM-1および抗LFA-1抗体の組合せ投与が促進されたあるいは相乗的效果を有するかどうかを決定するために、MLRアッセイ(実施例27に記載したようにして行った)を2つの抗体の種々の濃度の存在下で行った。このMLRアッセイは抗ICAM-1+抗LFA-1の組合せが、抗体単独では劇的にMLRを抑制しない濃度において、MLR応答を抑制するのに著しい効力があることを示した(表17)。この結果は抗ICAM-1抗体(またはそのフラグメント)と抗LFA-1抗体(またはそのフラグメント)の共投与を包含する治療が改善された抗炎症治療を与える能力を有することを示している。そのような改善された治療は治療上有効である他の場合よりも低い抗体投与量の投与を可能にし、また高濃度の個々の抗体が抗イデオタイプ応答を誘起するような場合に重要性を示す。

【0138】

【表17】

表 17  
混合リンパ球反応についての各種投与量での抗  
ICAM-1と(R3.1)抗LFA-1の効果

		%抑制					
濃度( $\mu$ g/ml)		抗-ICAM-1(R6-5-D6)					
抗-LFA-1	0	.004	.02	.1	.5	2.5	
0.0	0	7	31	54	69	70	
0.0008	1	7	28	48	62	71	
0.004	0	13	30	50	64	72	
0.02	29	38	64	75	84	86	
0.1	92.5	90	91	92	92	92	
0.5	93	90	90	92	93	91	

実施例29

移植した同種異系臓器の拒絶を抑制するのに抗ICAM-1抗体の効果

同種異系移植臓器の拒絶を抑制における抗ICAM-1抗体の効果を示すために、カニクイザルにCosimi等の方法(Transplant. Proc. 13; 499-503(1981))に従って同種異系の腎臓を移植した、ただし、麻酔薬としてバリウム(valium)とケタミンを用いる修

正を加えた。

【0139】即ち、腎臓移植を本質的に次のようにして行った。異型腎アログラフトを3~5kgのカニクイザルに、バリウムとケタミンによる麻酔の誘起後、本質的にMarquetにより記載されたようにして行った[Marquet等、Medical Primatology, Part II, Basel, Karger, p. 125)1972)。大動脈または大静脈のパッチ上のドナー腎臓の末端-側面アナストモシス(anas

tomoses)を7-0プロレン縫合線を用いて構築した。ドナー尿管をスパチュラ処理し外のう的方法によってブラッダー中に埋め込んだ〔Taguchi, Y. 等、Dausset 等編、Advances in Transplantation, バルチモア、ウィリアムス アンド ウィルキンズ、p 393 (1968)〕。腎機能を1週毎にまたは2週間毎の血清クリアチニン測定によって評価した。さらに、頻ばんなアログラフト生検を組織病理学検査用に採取し、完全解剖をすべての死んだ受容体で行った。殆どの受容体において、両側性腎摘出を移植時に行い、その後の尿毒症死をアログラフト生存の終点で考慮した。ある受容体において

は、片側の生腎摘出と対側尿管ライゲーションを移植時点で行った。アログラフト拒絶が生じたときは、同尿管上のライゲチュアを除去し、正常腎機能の再生と受容動物の免疫学的モニターを続ける機会を得た。

【0140】モノクローナル抗体R6-5-D6を12日間毎日投与したが、移出前2日から1~2mg/kg/日の投与量で開始した。クレアチニンの血清量を周期的試験して拒絶をモニターした。同種異系腎の免疫系拒絶に対する抗ICAM-1抗体の効果は図19に示す。

【0141】

【表18】

表 18  
同種異系腎受容体の生存時間

対照サル	生存時間 (days)	R6-5-D6 処理サル	生存時間 (days) <sup>a</sup>
1	8	1	20
2	11	2	8
3	11	3	30
4	10	4	31
5	9	5	11
6	10	6	23 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> 動物は移植前2日から12日間毎日1~2mg/kg/日で投与した。

【0142】<sup>b</sup> 1988年4月8日でまだ生存している。

【図面の簡単な説明】

【図1】正常細胞とLFA-1欠損細胞間の粘着を図式的に示す。

【図2】正常細胞/正常細胞粘着過程を図式的に示す。

【図3】50ng/mlのPMAの不存在(×)または存在(○)下の細胞凝集の動力学を示す。

【図4】LFA-1<sup>-</sup>細胞とLFA-1<sup>+</sup>細胞間の凝集を示す。図中に示すようにカルボキシフルオレスセインジアセテート標識EBV-形質転換細胞(10<sup>4</sup>)を10<sup>5</sup>未標識同元細胞(黒棒)またはJY(白棒)とPMAの存在下に混合した。1.5時間後、凝集物中または遊離の標識細胞を実施例2の定量アッセイを用いて計数した。凝集物中の標識細胞の%を示す。2つの内の1つの代表的な試験を示している。

【図5】JY細胞からのICAM-1とLFA-1の免疫沈降を示す。JY細胞のトリトンX-100溶解物(レーン1および2)または対照溶解バッファー(レーン3および4)をICAM-1に結合し得られる抗体(レーン1および3)またはLFA-1に結合し得る抗体(レーン2および4)で免疫沈降させた。パネルAは還元条件下での結果を示し、パネルBは非還元条件下で得られた結果を示す。分子量標準物はレーンSに示し

た。

【図6】ヒト皮ふ繊維芽細胞上のICAM-1発現に対してのIL-1とガンマーインターフェロンの効果の動力学を示す。ヒト皮ふ繊維芽細胞は8×10<sup>4</sup>細胞/0.32cm<sup>2</sup>のウェルの密度に増殖させた。IL-1(10μ/ml、黒丸)または組換えガンマーインターフェロン(10μ/ml、白四角)を加え、示した時間で、4℃に冷却し間接結合アッセイを実施した。標準偏差は10%を越えなかった。

【図7】ICAM-1へのIL-1とガンマーインターフェロン効果の濃度依存性を示す。ヒト皮ふ繊維芽細胞は8×10<sup>4</sup>細胞/0.32cm<sup>2</sup>/ウェルの密度に増殖させた。IL-2(白丸)、組換えヒトIL-1(白四角)、組換えマウスIL-1(黒四角)および組換えベータインターフェロン(白三角)を示した希釈率で4時間(IL-1)または16時間(ベータおよびガンマーインターフェロン)インキュベートした。示した結果は4回測定の平均を示し、標準偏差は10%を越えなかった。

【図8】ICAM-1 cDNAのヌクレオチドおよびアミノ酸配列を示す。第1ATGは位置58にある。ICAM-1トリプシンペプチドに相当する翻訳配列はアンダーラインを施してある。疎水性推定シグナルペプチドおよびトランスメンブリン配列は肉太アンダーラインを施している。N-結合グリコシル化部位は囲っている。位置2976のポリアデニル化シグナルAATAAは

オーバーラインを施している。図示した配列はHL-60 cDNAクローン用である。内皮細胞cDNAはその長さの大部分に亘って配列されており小さな差異のみを示した。

【図9】ICAM-1 cDNAのヌクレオチドおよびアミノ酸配列を示す。第1ATGは位置58にある。ICAM-1トリプシンペプチドに相当する翻訳配列はアンダーラインを施してある。疎水性推定シグナルペプチドおよびトランスメンブラン配列は肉太アンダーラインを施している。N-結合グリコシル化部位は囲っている。位置2976のポリアデニル化シグナルAATAAはオーバーラインを施している。図示した配列はHL-60 cDNAクローン用である。内皮細胞cDNAはその長さの大部分に亘って配列されており小さな差異のみを示した。

【図10】ICAM-1 cDNAのヌクレオチドおよびアミノ酸配列を示す。第1ATGは位置58にある。ICAM-1トリプシンペプチドに相当する翻訳配列はアンダーラインを施してある。疎水性推定シグナルペプチドおよびトランスメンブラン配列は肉太アンダーラインを施している。N-結合グリコシル化部位は囲っている。位置2976のポリアデニル化シグナルAATAAはオーバーラインを施している。図示した配列はHL-60 cDNAクローン用である。内皮細胞cDNAはその長さの大部分に亘って配列されており小さな差異のみを示した。

【図11】ICAM-1相同ドメインおよび免疫グロブリン超遺伝子群への相関を示す。(A) 5つの相同ドメインの配列(D<sub>1-5</sub>) : 列んだ2以上の同じ残基は囲っている。NCAMドメインに2回以上含まれる残基、およびセットC<sub>2</sub> およびC<sub>1</sub> のドメイン中に含まれる残基はICAM-1内部繰返しによって配列している。ICAM-1のドメイン中の予想βストランドの位置は棒線および配列上の小文字でマークしており、また免疫グロブリンcドメイン中のβ-ストランドの公知の位置は棒線および配列下の太文字でマークしている。ICAM-1ドメイン内の推定ジスルフィド架橋の位置はS-Sによって示している。ICAM-1に相同性のたん白質ドメインの(B-D)配列: 各たん白質はFASTPプログラムを用いてNBRFデータベースを調査することによって先ず配列する。各たん白質配列はMAG、NCAN、T細胞レセプターαサブユニットVドメイン、Ig

Mμ鎖およびα-1-B-糖たん白質である。

【図12】ICAM-1とMAGの二次構造の比較図である。

【図13】平坦膜中でICAM-1に結合しているLFA-1陽性EBV-形質転換B-リンパ芽球種(lymphoblastoid)細胞を示す。

【図14】プラスチック結合ベシクル中のICAM-1に結合しているLFA-1陽性T-リンパ芽球およびT-リンパ球を示す。

【図15】プラスチック結合ベシクル中のICAM-1に結合しているJY B-リンパ芽球腫の細胞またはベシクルのモノクローナル抗体による前処理による結合抑制を示す。

【図16】プラスチック結合ベシクル中のICAM-1へのT-リンパ芽球の結合に対しての温度の効果を示す。

【図17】プラスチック結合ベシクル中のICAM-1へのT-リンパ芽球の結合における二価のカチオンの必要性を示す。

【図18】末梢血液単核細胞がT-細胞会合抗原OKT3の認識に反応して増殖する能力に及ぼす抗接着性抗体の効果を示す。“OKT3”は抗原の添加を示す。

【図19】末梢血液単核細胞が、非特異的T-細胞分裂促進物質である、コンカナバリンAの認識に反応して増殖する能力に及ぼす抗接着性抗体の効果を示す。“CONA”はコンカナバリンAの添加を示す。

【図20】末梢血液単核細胞が、鍵穴カサガイヘモシアニン(keyhole limpet hemocyanin)抗原の認識に反応して増殖する能力に及ぼす抗接着性抗体の効果を示す。

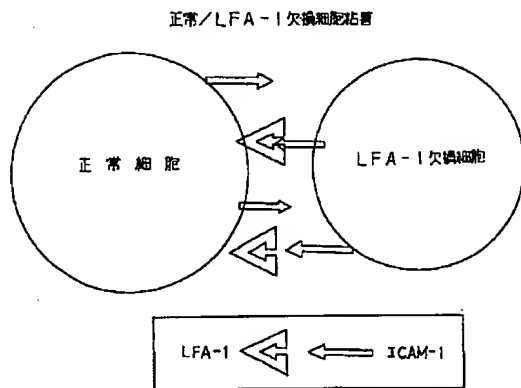
“KLH”は、鍵穴カサガイヘモシアニンの、細胞への添加を示している。

【図21】末梢血液単核細胞が、破傷風菌トキソイド抗原の認識に反応して増殖する能力に及ぼす抗接着性抗体の効果を示す。“AGN”は破傷風菌トキソイド抗原の、細胞への添加を示す。

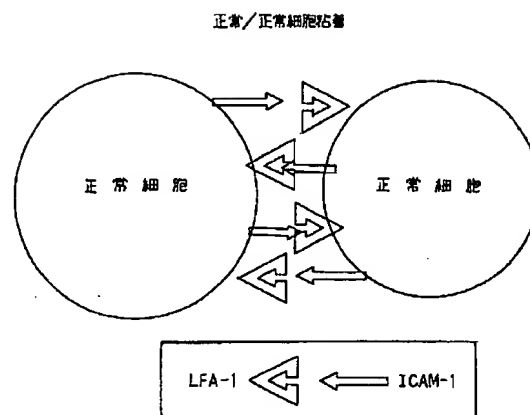
【図22】ヒト末梢単核細胞におけるICAM-1の発現を示している。(A) 応答細胞は培養されない;

(B) 応答X刺激細胞は培養されない;(C) 応答細胞は24時間培養される;(D) 応答X刺激細胞は24時間培養される。(-----モノクローナル抗体なし; ···マウスイムノグロブリン; ———— マウス抗-ICAM-1)。

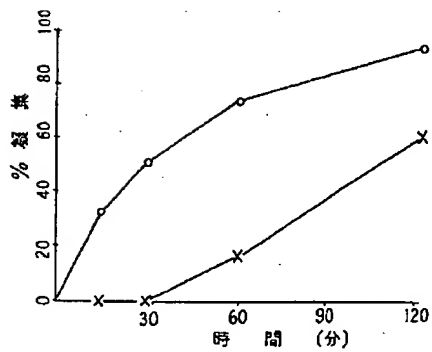
【図1】



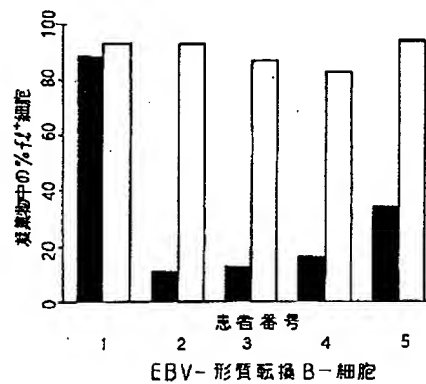
【図2】



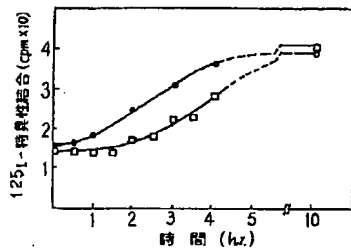
【図3】



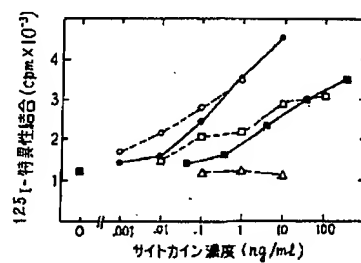
【図4】



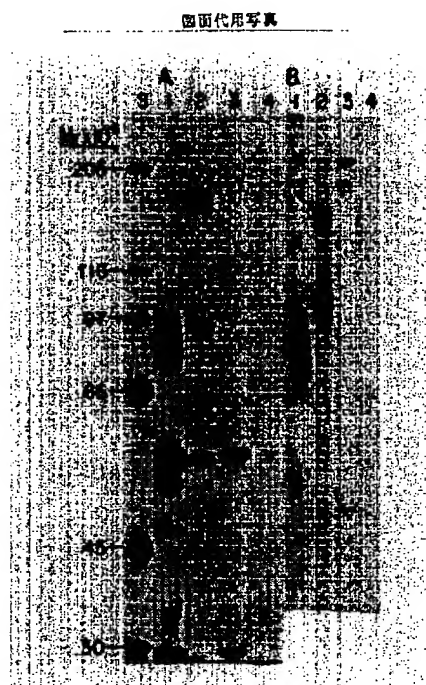
【図6】



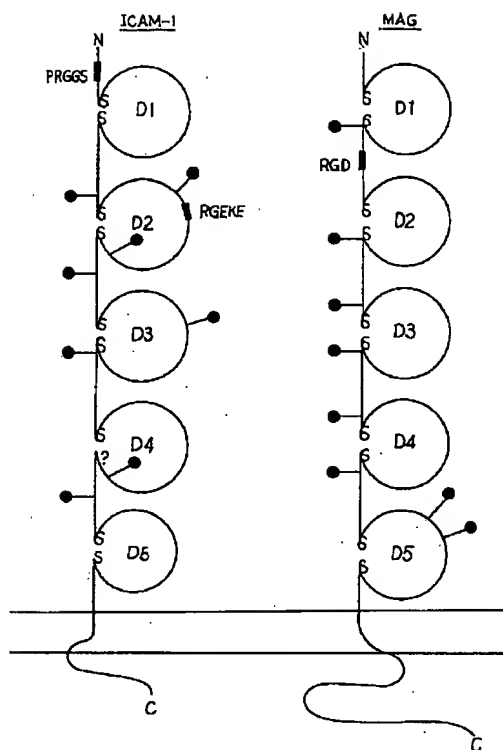
【図7】



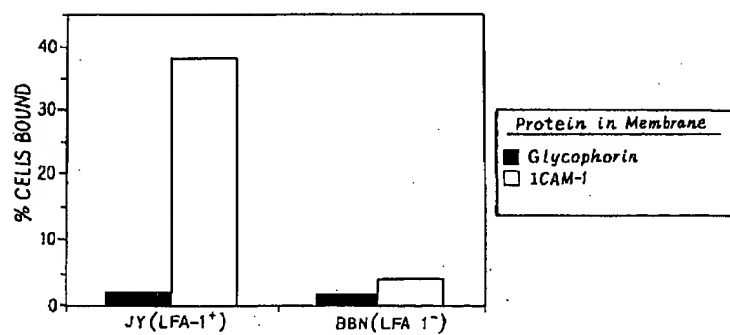
【図5】



【図12】



【図13】



【図8】

5' GGGGCGAGTGGAGGCTGAGCTTCTCTCTACGAGTTCGACGCTGAGCTGCT 57  
 ATG GCT CCC AGC AGC CCC GGG CTG GTC CTC CTG GCA GCA CTC TTC CCA GGA CTT GGC AAT GGC CAG ACA TCT 147  
 M A P S S P R P A L P A L L V L L G A L F P G P G N A Q T S 3  
 GTG TCC CCC TCA AAA GTC ATC CTG CCC GGG GGA GGC TCC GTC GTC GTC ACA TCC AGC ACC TCC TGT GAC CAG CCC AAG TTG TTG GGC ATA 237  
 V S P S K K V I L P R G G S V L V T C S T S C D Q P K L L G I 33  
 CAG ACC CCG TTG CTT AAA AAG GAG TTG CTC CTG CTT GGG AAC CCG ANG GTG TAT GAA CTG AGC AAT GTG CAA GAA GAT ACC CAA CCA 327  
 E T P L P K K E L L L L P G N N R K V Y E L S N V Q E D S Q P 63  
 ATG TCC TAT TCA AAC TCC CTT GAT GGT CAG TCA ACA CTT AAA ACC TTC CTC ACC GTG TAC TGG ACT CCA GAA CCG GTG GAA CTG CCA CCC 417  
 M C Y S N C P D G G Q S T A K T F L T V Y W T P E R V E L A P 93  
 CTC CCC TCT TGG CAG CCA GTC CCC ANG AAC CTT ACC CTA CCC TCC CAG GTG CAG CCG CCA CCG GGC AAC CTC ACC GTG GTG CTG 507  
 L P S W Q P V G K N L T L R C Q V E G G A P R A N L T V V L 123  
 CTC GGT GGG CAG AAG CAG CTG AAA CCG CAG CCA CTT GTG CCG CAG CCC CTT CAG GTG ACC AGC AGC GTG CTG AGG AGA GAT CAC CAT 597  
 L R G E K E L K R E P A V G E P A E V T T V L V R R D H H 153  
 CGA GGC AAT TTC TTG TCC CCG ACT GAA CTG GAC CTG CCG CCC CAA CCG CTG GAG CTG TTT CAG AAC ACC TTG CCC CCG TAC CAG CTC CAG 687  
 G A N F S C R T E L L D L R P Q G L E L F E N T S A P Y Q L Q 183  
 ACC TTT GTC CTG CCA CCG ACT CCC CCA CAA CTT GTC AGC CCC GTC CTA GAG CTG GAC AGG CAG CCG ACC GTG GTC TGT TCC CTG GAC 777  
 T F V L L P A T P P Q L V S P R V L E V D T Q G T V V C S L D 213

【図9】

GGG CTG TTC CCA GTC TGG GAG GGC CAG GTC CAC CTG CCA CTG GGC GAC AGG TTG AAC CCC ACA GTC ACC TAT GGC AAC CAC TCC TTC 867  
 G L F P V S E A Q V H L A L G D Q R L N P T V T Y G N D S F 243

---

TCG CCC AAG GGC TCA GTC AGT GTC ACC GCA GAG GAC GAG GGC ACC CAG GCG CTG AGG TGT GCA GTA ATA CTG GCG AAC CAG ACC CAG CAG 957  
 S A K A S V S V T A E D E G T Q R L T C A V I L G N Q S Q E 273

---

ACA CTG CAG ACA GTC ACC ATC TAC ACC TTT CCG GCG CCC AAC GTG ATT CTG ACC AAG CCA GAG GTC TCA GAA GCG ACC GAG GTG ACA GTG 1047  
 T L Q T V T I Y S F P A P N V I L T K P E V S E G T E V T V 303

---

AAG TGT GAG GGC CAC CCT ACA GGC AAC GTG AGG CTG AAT GCG GTT CCA GGC CAG CCA CTG GCG AGG GGC CAG CTC CTG CAG AAC GGC 1137  
 K C E A H P R A K V T L N G V P A Q P L G P R A Q L L L L K A 333

---

ACC CCA GAG CAC AAC GCG GGC ACC TTC TGC TGT GCA ACC CTG GAG GTG GGC GCG CAG CTT ATA CAC AAG AAC CAG ACC CCG GAG CTT 1227  
 T P E D N G R S F S C S A T L E V A G Q L I H K N Q T R E L 363

---

CCT GTC CTG TAT GGC CCC CGA CTG CAC GAG AAG GAT TGT CCG CCA AAG TGG ACG TGG CCA GAA AAT TCC CAG CAG ACT CCA ATG TCC CAG 1317  
 R V L Y G P R L D E R D C P G N W T W P E N S Q Q T P M C Q 393

---

CCT TGG GCG AAC CCA TTG CCC GAG CTC AAG TGT CTA AAG GAT GGC ACT TTC CCA CTG CCC ATC GCG GAA TCA GTG ACT GTC ACT CGA GAT 1407  
 A W G N P L P E L K C L K D G T F P L P I G E S V T V T R D 423

---

CTT CAG GGC ACC TAC CTC TGT GCG GGC AGG ACC ACT CAA GCG GAG GTC ACC CCG GAG GTG ACC GTG ANT GTG CTC TCC CCG TAT GAG 1497  
 L E G T Y L C R A R S T Q G G E V T R E V T V N V L S P R Y E 453

---

ATT GTC ATC ATC ACT GTG GTA CCA GGC CCA GTC ATA ATG GGC ACT CCA GCG CTC ACC ACG TAC CTC TAT AAC CCG CAG CCG AAG ATC AAG 1587  
 I V I I T V V A A A V I M G T A G L S T Y L Y N R Q R K I K 483

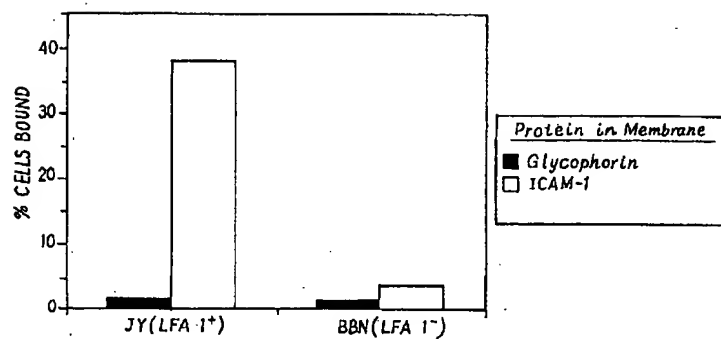
【図10】

[illegible]

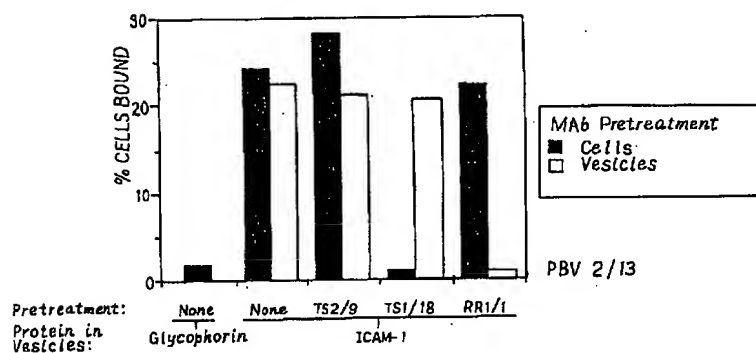




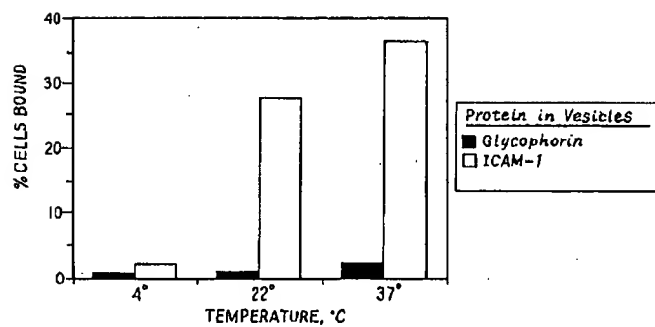
【図14】



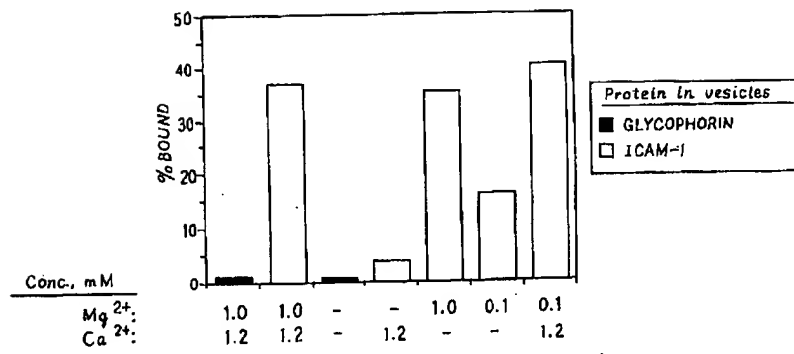
【図15】



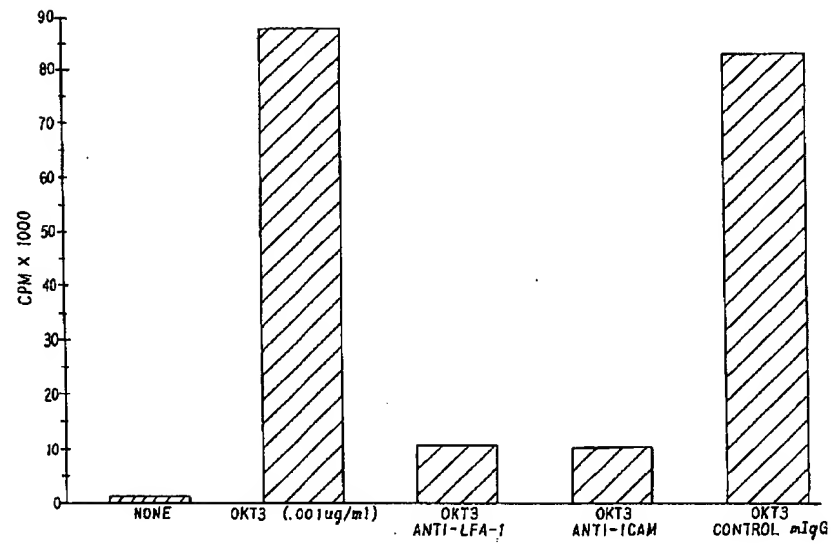
【図16】



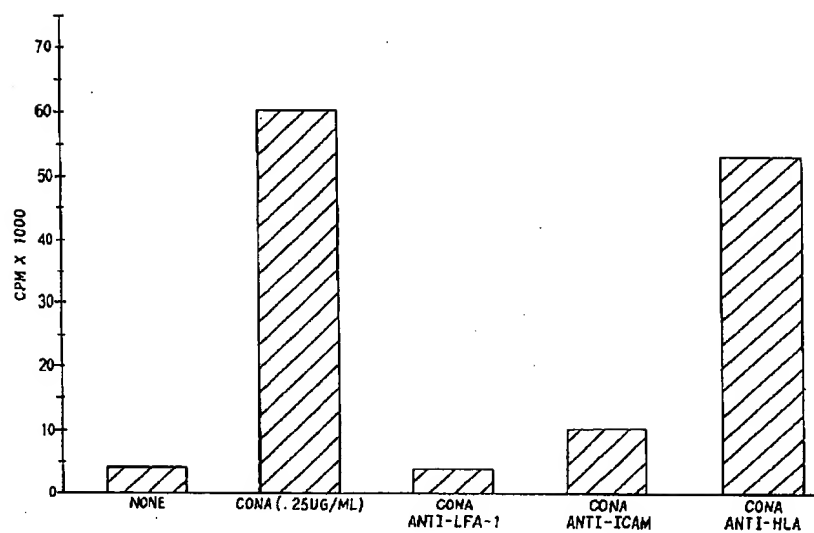
【図17】



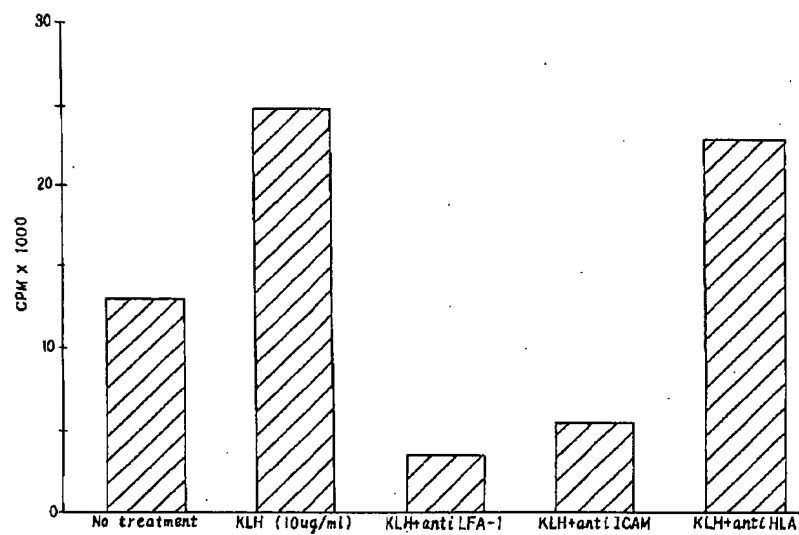
【図18】



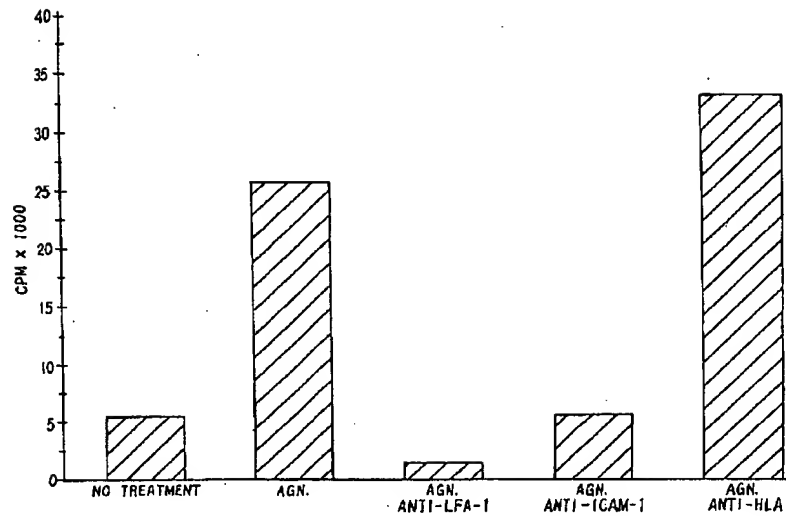
【図19】



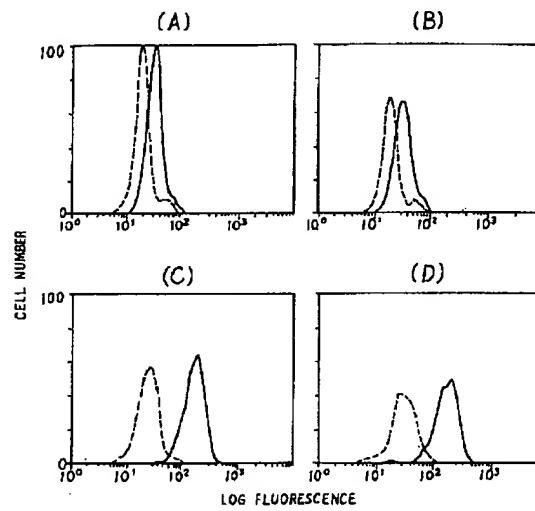
【図20】



【図21】



【図22】



フロントページの続き

(51)Int. Cl.<sup>6</sup>

識別記号

F I

C 1 2 N 5/10

C 1 2 P 21/08

15/02

Z N A

A 6 1 K 37/02

A B E

G 0 1 N 33/53

A D U

33/577

C 1 2 N 5/00

B

// C 1 2 P 21/08

15/00

Z N A B

(C 1 2 P 21/08

C 1 2 R 1:91)

(72)発明者 ロバート ロースレイン  
アメリカ合衆国 コネチカット州 06811  
ダンバリー タマニー トレイル 32

(72)発明者 スティーヴン ディーン マーリン  
アメリカ合衆国 コネチカット州 06811  
ダンバリー テラ ホート ロード 18  
(72)発明者 マイケル ローラン ダスティン  
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州  
02215 ボストン 23 パーク ドライヴ  
231